

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-542466

(P2002-542466A)

(43) 公表日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テコト (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/033	5 0 1	A 0 1 K 67/033	5 0 1 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/01		G 0 1 N 33/15	Z
15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N 33/15			X
		審査請求	未請求 予備審査請求 有 (全 133 頁)

(21) 出願番号 特願2000-612504(P2000-612504)
(86) (22) 出願日 平成12年4月14日 (2000. 4. 14)
(85) 翻訳文提出日 平成13年10月15日 (2001. 10. 15)
(86) 国際出願番号 P C T / I B 0 0 / 0 0 5 7 5
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 3 4 2 7
(87) 国際公開日 平成12年10月26日 (2000. 10. 26)
(31) 優先権主張番号 9 9 0 8 6 7 0 , 4
(32) 優先日 平成11年4月15日 (1999. 4. 15)
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 2 9 , 5 9 6
(32) 優先日 平成11年4月15日 (1999. 4. 15)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャ
ップ
DEVGEN nv
ベルギー、バー-9052ヘントーズウェイナ
ールデ、テヒノロギーバルク9番
(72) 発明者 フィリップ・ヴェルヴェールド
ベルギー、バー-9052ヘントーズウェイナ
ールデ、テヒノロギーバルク9番、デフヘ
ン・ナムローゼ・フェンノートシャップ
(74) 代理人 弁理士 青山 蓑 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物スクリーニング法

(57) 【要約】

本発明は、高処理能力形式で行うのに適した、線虫、特
に非排他的に *C. elegans* を用いるスクリーニン
グ法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と化学物質とを接触させる工程と、

(c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を示すシグナルを検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 2】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の異なる変異線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、

(c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を示すシグナルを検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 3】 線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

(a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、

(b) 1つの変異誘発 F 1 線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(c) F 1 線虫に F 2 子孫を産生させる工程と、

(d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、

(e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 4】 遺伝学的技術を使用して工程 (e) においてシグナルを発生させる線虫で変異した遺伝子の単離工程をさらに包含する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と前記第 1 の化合物とを接触させる工程と、

(c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、

(d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を示すシグナルを検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 6】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を抑制する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を向上させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】 前記線虫が微視的線虫である、請求項 1 ～請求項 7 のいずれか 1 項に記載方法。

【請求項 9】 前記線虫が *C. elegans* または *C. briggsae* である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記シグナル検出工程がマーカー分子の測定可能な性質の変化を検出する工程をさらに包含し、前記マーカー分子の性質の変化が前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を示す、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】 前記マーカー分子が、蛍光分子、発光分子、または有色分子である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 前記マーカー分子が、蛍光分子の前駆体、発光分子の前駆体、または有色分子の前駆体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】 前記マーカー分子が *C. elegans* の腸に存在する酵素の作用によって切断されて、蛍光分子、発光分子、または有色分子を得ることができる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 前記マーカー分子が遺伝子コードマーカー分子である、請

求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】 前記線虫が前記遺伝子コードマーカ分子を発現するトランスジェニック線虫である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 前記遺伝子コードマーカ分子が、自己蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、 β グルクロニダーゼ、 β ラクタマーゼ、 β ガラクトシダーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ノパリンシンターゼ、オクタピンシンターゼ、またはエクオリンである、請求項 14 または請求項 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】 前記非視覚的検出手段がマルチウェルプレートリーダーである、請求項 1 ～請求項 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】 前記マルチウェルプレートリーダーが、発光、蛍光、または分光光度検出を行う、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】 前記非視覚的検出手段が FANS デバイスである、請求項 1 ～請求項 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】 前記 FANS デバイスが、発光、蛍光、または分光光度検出を行う、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 前記シグナル検出工程が、FANS デバイスを用いた線虫のサイズおよび／または発達期の検出を包含する、請求項 1 ～請求項 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】 卵、L1 期、L2 期、L3 期、L4 期、成虫蠕虫、および耐性蠕虫の検出を包含する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 前記工程 (a) が実施的に同量の線虫の均一な懸濁液をマルチウェルプレートアッセイプレートの各ウェルに分配する工程を包含する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】 前記均一な懸濁液は、粘性溶液中に *C. elegans* の懸濁液を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】 前記粘性溶液はポリマー材料の溶液を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】 前記ポリマー材料は低融点アガロースである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 前記線虫を同一の成長期に合わせる、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】 前記線虫が卵、L1 期、L2 期、L3 期、L4 期、成虫蠕虫、または耐性蠕虫である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】 前記蠕虫が雌雄同体または雄である、請求項 27 または請求項 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】 前記線虫は、野生株、変異株、トランスジェニック株、または、ヒト化株である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】 前記線虫がヒト起源の 1 つまたは複数のタンパク質コード核酸配列を発現するヒト化株である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】 前記線虫が、毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現するトランスジェニック *C. elegans* である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、best 黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、または *unc-53* 遺伝子産物をコードする、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】 前記毒性遺伝子発現が、単一の組織、細胞型のサブセット、単一の細胞型、または単一の *C. elegans* 細胞の遺伝子発現を指向することができる組織特異的プロモーターによって駆動される、請求項 32 または請求項 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】 前記毒性遺伝子の発現が *daf-7* プロモーターによって駆動される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】 前記方法が培地の粘度を増大させるのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地中で行われる、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】 前記水溶性ポリマーがカルボキシメチルセルロース、低融点アガロース、またはポリエチレングリコールである、請求項 36 に記載の方法

。

【請求項 38】 前記水溶性ポリマーが培地粘性カルボキシメチルセルロースである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.3% である、請求項 36 ～請求項 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】 前記方法が、線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地で行われる、請求項 1 ～請求項 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 42】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.01% ～ 10% である、請求項 40 または請求項 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】 前記液体培地中の水溶性ポリマーの濃度が 0.1% である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、

(c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の咽頭ポンピング速度の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 45】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、

(c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の咽頭ポンピング速度の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 4 6】 線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

- (a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、
- (b) 1つの変異誘発 F 1 線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (c) F 1 線虫に F 2 子孫を産生させる工程と、
- (d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、
- (e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の咽頭ポンピング速度の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 4 7】 遺伝学的技術を使用して工程 (e) において咽頭ポンピング速度の変化を示す線虫で変異した遺伝子の単離工程をさらに包含する、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記第 1 の化合物とを接触させる工程と、
- (c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、
- (d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の咽頭ポンピング速度の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 4 9】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を抑制する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を向上させる、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】 前記線虫が微視的線虫である、請求項 4 4 ~ 請求項 5 0 のいずれか 1 項に記載方法。

【請求項 5 2】 前記線虫が *C. elegans* または *C. briggsae* である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】 前記咽頭ポンピング速度の変化の検出工程が、前記線虫と

線虫に取り込まれた場合にシグナルを発するマーカー分子との接触工程および、非視覚的検出手段を用いて前記シグナルを検出する工程を包含する、請求項44～請求項52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】 前記マーカー分子が、蛍光分子、発光分子、有色分子、蛍光マーカー分子の前駆体、発光マーカー分子の前駆体、または有色マーカー分子の前駆体である、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記マーカー分子が線虫の腸に存在する酵素の作用によって切断されて、蛍光分子、発光分子、または有色分子を得ることができる、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記マーカー分子が、カルセイン-AM、BCECF-AM、フルオレセインニリン酸(FDP)、フルオレセインニ酢酸(FDA)、CMB-leu、AMPPD、またはX-glcである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 前記マーカー分子がpH変化に感受性を示す、請求項55に記載の方法。

【請求項58】 前記非視覚的検出手段がマルチウェルプレートリーダーである、請求項44～請求項57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】 前記マルチウェルプレートリーダーが、発光、蛍光、または分光光度検出を行う、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記非視覚的検出手段がFANSデバイスである、請求項44～請求項57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】 前記FANSデバイスが、発光、蛍光、または分光光度検出を行う、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 前記線虫が野生型変異、トランスジェニック、またはヒト化*C. elegans*である、請求項44～請求項61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】 前記*C. elegans*が咽頭ポンピング速度の変化を示す、請求項62に記載の方法。

【請求項64】 前記変異*C. elegans*がSERCAタンパク質およ

び／またはPLBタンパク質および／またはSLNタンパク質をコードする遺伝子の変異を保有する、請求項62に記載の方法。

【請求項65】 前記トランスジェニック*C. elegans*はSERCAタンパク質またはPLBタンパク質をコードする導入遺伝子を発現する、請求項63に記載の方法。

【請求項66】 前記導入遺伝子の存在が組織特異的プロモーターによって駆動される、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 前記トランスジェニック*C. elegans*はSERCAタンパク質をコードする*C. elegans*遺伝子中に変異をさらに保有する、請求項65または請求項66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項68】 前記*C. elegans*が、1つまたは複数の以下の神経伝達物質：アセチルコリン、セロトニン、グルタミン酸、オクトパミン、GABA、またはドーパミンの1つまたは複数のレベルの変化を示す、請求項62に記載の方法。

【請求項69】 前記トランスジェニック*C. elegans*は毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現する、請求項62に記載の方法。

【請求項70】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、best黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、またはunc-53遺伝子産物をコードする、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 前記毒性遺伝子の発現が、*C. elegans*の咽頭、*C. elegans*の細胞のサブセット、咽頭ニューロン、または単一の咽頭ニューロンの遺伝子発現を指向することができる組織特異的プロモーターによって駆動される、請求項69または請求項70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項72】 前記毒性遺伝子の発現が、myo-2プロモーター、unc-129プロモーター、tmy-1プロモーター、またはdaf-7プロモーターによって駆動される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】 前記導入遺伝子の発現がdaf-7プロモーターによって駆動される、請求項69または請求項70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7 4】 前記線虫を同一の成長期に合わせる、請求項 4 4～請求項 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】 前記線虫が卵、L 1 期、L 2 期、L 3 期、L 4 期、成虫蠕虫、または耐性蠕虫である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】 前記蠕虫が雌雄同体または雄である、請求項 7 4 または請求項 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】 前記方法が培地の粘度を増大させるのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地中で行われる、請求項 4 4～請求項 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】 前記水溶性ポリマーがカルボキシメチルセルロース、低融点アガロース、またはポリエチレングリコールである、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】 前記水溶性ポリマーが培地粘性カルボキシメチルセルロースである、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0. 3 % である、請求項 7 7～請求項 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 1】 前記方法が、線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地で行われる、請求項 4 4～請求項 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンである、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0. 0 1 %～1 0 % である、請求項 8 1 または請求項 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】 前記液体培地中の水溶性ポリマーの濃度が 0. 1 % である、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】 潜在的な殺虫活性を有する化学物質の同定に使用される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同

定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、

(c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫細胞中の鉄、代謝産物、または二次メッセンジャーレベルの変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 87】 カルシウム、cAMP、ジアシルグリセロール、またはIP3の細胞内レベルの変化の検出を包含する、請求項 86に記載の方法。

【請求項 88】 前記線虫は、遺伝子コードマーカ分子を発現するトランスジェニック *C. elegans* であり、前記マーカ分子は鉄、代謝産物、または二次メッセンジャーの細胞内レベルの変化に応答してシグナルを発し、工程 (c) が前記遺伝子コードマーカ分子によって発生するシグナルの変化の検出工程を包含する、請求項 87に記載の方法。

【請求項 89】 前記遺伝子コードマーカ分子がGFP-カルモジュリンまたはエクオリンである、請求項 88に記載の方法。

【請求項 90】 前記遺伝子コードマーカ分子が、トランスジェニック *C. elegans* の咽頭、陰門、体壁筋、またはニューロンにおいて発現される、請求項 88または請求項 89のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 91】 前記非視覚的検出手段がマルチウェルプレートリーダーである、請求項 86～請求項 90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 92】 前記マルチウェルプレートリーダーが、蛍光、発光、または分光光度検出を行う、請求項 91に記載の方法。

【請求項 93】 前記非視覚的検出手段がFANSデバイスである、請求項 86～請求項 90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 94】 前記FANSデバイスが、蛍光、発光、または分光光度検出を行う、請求項 93に記載の方法。

【請求項 95】 前記線虫を同一の成長期に合わせる、請求項 86～請求項 94のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 96】 前記線虫が卵、L1期、L2期、L3期、L4期、成虫蠕

虫、または耐性蠕虫である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】 前記蠕虫が雌雄同体または雄である、請求項 9 5 または請求項 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 8】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の運動性の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 9 9】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の運動性の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 1 0 0】 線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

- (a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、
- (b) 1 つの変異誘発 F 1 線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (c) F 1 線虫に F 2 子孫を産生させる工程と、
- (d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、
- (e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の運動性の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 1 0 1】 遺伝学的技術を使用して工程 (e) において運動性の変化を示す線虫で変異した遺伝子の単離工程をさらに包含する、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 102】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と前記第 1 の化合物とを接触させる工程と、

(c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、

(d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の運動性の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 103】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を抑制する、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】 前記第 2 の化学物質が線虫に対する第 1 の化合物の定義された効果を向上させる、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】 前記線虫が微視的線虫である、請求項 98 ~ 請求項 104 のいずれか 1 項に記載方法。

【請求項 106】 前記線虫が *C. elegans* または *C. briggsae* である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】 前記線虫の運動性の変化の検出工程が、マルチウェルアッセイプレートのウェル中の材料の小領域の自己蛍光レベルの測定を包含する、請求項 98 ~ 請求項 106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】 前記非視覚的検出手段がマルチウェルプレートリーダーである、請求項 98 ~ 請求項 107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】 前記マルチウェルプレートリーダーが、発光、蛍光、または分光光度検出を行う、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 110】 前記線虫を同一の成長期に合わせる、請求項 98 ~ 請求項 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 111】 前記線虫が卵、L1 期、L2 期、L3 期、L4 期、成虫蠕虫、または耐性蠕虫である、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】 前記蠕虫が雌雄同体または雄である、請求項 110 または請求項 111 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 113】 前記線虫は、野生株、変異株、トランスジェニック株、または、ヒト化株である、請求項 98～請求項 112 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 114】 前記線虫がヒト起源の 1 つまたは複数のタンパク質コード核酸配列を発現するヒト化株である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】 前記線虫が、毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現するトランスジェニック *C. elegans* である、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、*best* 黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、または *unc-53* 遺伝子産物をコードする、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】 前記遺伝子発現が、単一の組織、細胞型のサブセット、単一の細胞型、または単一の *C. elegans* 細胞の遺伝子発現を指向することができる組織特異的プロモーターによって駆動される、請求項 115 または請求項 116 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 118】 前記毒性遺伝子の発現が *daf-7* プロモーターによって駆動される、請求項 117 に記載の方法。

【請求項 119】 前記方法が培地の粘度を増大させるのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地中で行われる、請求項 98～請求項 118 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 120】 前記水溶性ポリマーがカルボキシメチルセルロース、低融点アガロース、またはポリエチレングリコールである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】 前記水溶性ポリマーが培地粘性カルボキシメチルセルロースである、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.3% である、請求項 119～請求項 121 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 123】 前記方法が、線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地で行わ

れる、請求項 98～請求項 118 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 124】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンである、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.01%～10% である、請求項 123 または請求項 124 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 126】 前記液体培地中の水溶性ポリマーの濃度が 0.1% である、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 127】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 実質的に同数の雄線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(c) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、

(d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 128】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(b) 実質的に同数の雄線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程であって、前記雄線虫は、異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化線虫のパネルを形成し、

(c) 前記線虫と化学物質とを接触させる工程と、

(d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 129】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 実質的に同数の雄線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (c) 前記線虫と第1の化学物質とを接触させる工程と、
- (d) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、
- (e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項130】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を抑制する、請求項129に記載の方法。

【請求項131】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を向上させる、請求項129に記載の方法。

【請求項132】 前記線虫が微視的線虫である、請求項127～請求項131のいずれか1項に記載方法。

【請求項133】 前記線虫が*C. elegans*または*C. briggsae*である、請求項132に記載の方法。

【請求項134】 前記雌雄同体線虫および／または雄線虫が変異、トランスジェニック、またはヒト化*C. elegans*である、請求項133に記載の方法。

【請求項135】 前記トランスジェニック*C. elegans*が毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現する、請求項134に記載の方法。

【請求項136】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、*best*黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、または*unc-53*遺伝子産物をコードする、請求項135に記載の方法。

【請求項137】 前記毒性遺伝子の発現が*her-1* P2プロモーター、*mab-18*プロモーター、または*spe-T1*プロモーターによって駆動される、請求項135または請求項136のいずれか1項に記載の方法。

【請求項138】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の

同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 139】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化雌雄同体線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 140】 線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

- (a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、
- (b) 1つの変異誘発 F1 線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (c) F1 線虫に F2 子孫を産生させる工程と、
- (d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、
- (e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 141】 遺伝学的技術を使用して工程 (e) において卵または子孫の産生量の変化を示す線虫で変異した遺伝子の単離工程をさらに包含する、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 142】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

- (b) 前記線虫と前記第1の化合物とを接触させる工程と、
- (c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、
- (d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の卵または子孫の産生量の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項143】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を抑制する、請求項142に記載の方法。

【請求項144】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を向上させる、請求項142に記載の方法。

【請求項145】 前記雌雄同体線虫が、変異、トランスジェニック、またはヒト化 *C. elegans* である、請求項138に記載の方法。

【請求項146】 前記トランスジェニック *C. elegans* が毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現する、請求項145に記載の方法。

【請求項147】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、*best* 黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、または *unc-53* 遺伝子産物をコードする、請求項146に記載の方法。

【請求項148】 前記毒性遺伝子の発現が *lin-31* プロモーター、*egl-17* プロモーター、*unc-17* プロモーター、または *unc-53* プロモーターによって駆動される、請求項146または請求項147のいずれか1項に記載の方法。

【請求項149】 前記トランスジェニック *C. elegans* がマーカー分子を発現する、請求項134または請求項145のいずれか1項に記載の方法。

【請求項150】 前記マーカー分子が、自己蛍光タンパク質である、請求項149に記載の方法。

【請求項151】 前記卵または子孫の産生量の検出工程が、卵、L1期、L2期、L3期、またはL4期の線虫に結合する特異的抗体を添加する工程および前記抗体と卵、L1期、L2期、L3期、またはL4期の線虫との結合によって形成された複合体を非視覚的検出手段を使用して検出する工程とを包含する、

請求項 127～請求項 150 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 152】 前記非視覚的検出手段がマルチウェルプレートリーダーである、請求項 127～請求項 151 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 153】 前記卵または子孫の量の検出工程が、FANS デバイスを使用して卵または子孫数を直接計数する工程を包含する、請求項 127～請求項 153 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 154】 前記卵または子孫の産生量の検出工程が、孵化の際に卵から放出される酵素の活性を検出する工程を包含する、請求項 127 に記載の方法。

【請求項 155】 孵化の際に卵から放出されるキチナーゼの活性を検出する工程を包含する、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 156】 前記方法が培地の粘度を増大させるのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地中で行われる、請求項 127～請求項 155 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 157】 前記水溶性ポリマーがカルボキシメチルセルロース、低融点アガロース、またはポリエチレングリコールである、請求項 156 に記載の方法。

【請求項 158】 前記水溶性ポリマーが培地粘性カルボキシメチルセルロースである、請求項 157 に記載の方法。

【請求項 159】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.3% である、請求項 156～請求項 158 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 160】 前記方法が、線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地で行われる、請求項 127～請求項 155 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 161】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンである、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 162】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が 0.01%～10% である、請求項 160 または請求項 161 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 163】 前記液体培地中の水溶性ポリマーの濃度が0.1%である、請求項 162に記載の方法。

【請求項 164】 線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の雌雄同体線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と化学物質のサンプルとを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の排泄挙動の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 165】 線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の排泄挙動の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 166】 線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

- (a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、
- (b) 1つの変異誘発 F1 線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (c) F1 線虫に F2 子孫を産生させる工程と、
- (d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、
- (e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の排泄挙動の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項 167】 遺伝学的技術を使用して工程 (e) において排泄速度の変化を示す線虫で変異した遺伝子の単離工程をさらに包含する、請求項 166に記載の方法。

【請求項 168】 化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第 1 の

化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

(a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレート各ウェルに分配する工程と、

(b) 前記線虫と前記第1の化合物とを接触させる工程と、

(c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、

(d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の排泄挙動の変化を検出する工程とを包含する、方法。

【請求項169】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を抑制する、請求項168に記載の方法。

【請求項170】 前記第2の化学物質が線虫に対する第1の化合物の定義された効果を向上させる、請求項168に記載の方法。

【請求項171】 前記線虫が微視的線虫である、請求項170に記載方法

。 【請求項172】 前記線虫が *C. elegans* または *C. briggsae* である、請求項171に記載の方法。

【請求項173】 前記線虫が、変異、トランスジェニック、またはヒト化 *C. elegans* である、請求項172に記載の方法。

【請求項174】 前記変異 *C. elegans* が異常な排泄挙動を示す、請求項173に記載の方法。

【請求項175】 前記変異 *C. elegans* が便秘している、請求項174に記載の方法。

【請求項176】 前記トランスジェニック *C. elegans* が毒性遺伝子を含む導入遺伝子を発現する、請求項174に記載の方法。

【請求項177】 前記毒性遺伝子が、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、best 黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、または *unc-53* 遺伝子産物をコードする、請求項176に記載の方法。

【請求項178】 前記毒性遺伝子の発現が、*unc-43* プロモーターまたは *unc-25* プロモーターによって駆動される、請求項176または請求項

177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項179】 前記方法が培地の粘度を増大させるのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地中で行われる、請求項164～請求項178のいずれか1項に記載の方法。

【請求項180】 前記水溶性ポリマーがカルボキシメチルセルロース、低融点アガロース、またはポリエチレングリコールである、請求項179に記載の方法。

【請求項181】 前記水溶性ポリマーが培地粘性カルボキシメチルセルロースである、請求項180に記載の方法。

【請求項182】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が0.3%である、請求項179～請求項181のいずれか1項に記載の方法。

【請求項183】 前記方法が、線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーを含む液体アッセイ培地で行われる、請求項164～請求項178のいずれか1項に記載の方法。

【請求項184】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、またはポリビニルピロリドンである、請求項183に記載の方法。

【請求項185】 前記液体培地中の水溶性ポリマー濃度が0.01%～10%である、請求項183または請求項184のいずれか1項に記載の方法。

【請求項186】 前記液体培地中の水溶性ポリマーの濃度が0.1%である、請求項185に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、薬理学分野、特に *Caenorhabditis elegans* などの線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質のスクリーニングに関する。詳細には、本発明は、マルチウェルプレート形式で行われる高処理スクリーニングを適用した方法に関する。

【0002】

C. elegans は、土壤中に天然に存在するが、細菌 *E. coli* などの食物源（好ましくは、*E. coli*）と共に播種した栄養寒天上で実験室にて容易に成長させることができる線虫である。各蠕虫は幼虫から体長約 1 mm の成虫まで 3 日ほどで成長する。その寿命の全ての段階で完全に透明であるので、細胞分裂、移動、および分化が生きた動物で容易に認めることができる。さらに、その解剖学的性質が単純であるにもかかわらず、体細胞は、筋肉、ニューロン、腸、および表皮を含む最も主要な分化組織型を示す。したがって、野生型蠕虫とかけ離れた表現型の相違が顕微鏡で直接か選択染色法によって比較的容易に観察される。

【0003】

C. elegans のこれらの特徴により、薬物発見工程における非常に有用なツールとなる。特に、*C. elegans* を、試験化合物に暴露して任意の得られた表現型および／または挙動の変化を記録する、潜在的な候補薬物の同定に有用な高処理化合物スクリーニングの開発に使用することができる。

【0004】

C. elegans が、特定の化合物への暴露および選択変異によって作製された *C. elegans* 表現型の比較によって外部分子と特異的遺伝子との間の相互作用の確立に有用であり得る可能性は、Rand and Johnson、*Methods of Cell Biology*、第 8 章、第 84 巻、「*Caenorhabditis elegans*: 現在の生物学的生物分析」、Epstein and Shakes、Academic Press、1995 および J. Ahringer、*Curr. Op. in Gen. and De*

v.、7、1997、410~415によって考慮されている。

【0005】

特に、Rand and Johnsonは、種々の濃度の試験化合物を栄養寒天およびブロスに添加し、その後細菌を播種して蠕虫とインキュベートする化合物スクリーニングアッセイを記載している。次いで、化合物への暴露の結果としての蠕虫の任意の表現型の変化を観察する。

【0006】

線虫、特に*C. elegans*は薬理学的に活性な分子の同定または発見に強力で有効なツールを提供するにもかかわらず、現在公知の化合物スクリーニング技術は高処理スクリーニングに容易に供されない。これは、主に、化合物が蠕虫の表現型に対する効果を有するかどうかを決定するために公知のアッセイ技術が試験化合物に暴露される蠕虫の視覚的検査に依存するためである。従って、たとえ高処理スクリーニングに必要なマルチウェルアッセイ形式で行われても、アッセイ結果を同定するために肉眼で各ウェルを記録する必要がある。

【0007】

したがって、目視検査による記録を必要としないので自動化高処理スクリーニングでの使用により適切な生きた*C. elegans*を使用した信頼でき且つ再現性のあるスクリーニング法が必要である。このようなスクリーニング法が利用可能になれば、*C. elegans*のスクリーニングツールとしての有用性は劇的に増大し、研究者が薬物発見および開発用の全動物系として非常に潜在的な*C. elegans*を利用することができる。

【0008】

従って、第1の態様では、本発明は、線虫を用いた潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と化学物質とを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を検出する工程とを包含する方法を提供する。

【0009】

この方法は、事実上、蠕虫が候補化合物に暴露されて化合物への暴露の結果として蠕虫の表現型、挙動、生化学、または生理学の変化を記録する、標準的な化合物スクリーニングである。このようなアッセイを、野生型線虫を使用して行うことができ、この場合、工程(c)で検出される「変化」は、一般に、野生型の挙動などからかけ離れた変化である。しかし、検出される活性の型に依存して、化合物スクリーニングを、非野生型線虫（例えば、非野生型特性を示すことができる変異またはトランスジェニック蠕虫）を使用して行うこともできる。この場合、工程(c)で検出される「変化」は、野生型の逆であり得る。典型的には、化合物スクリーニングアッセイは、異なる濃度の試験化学物質と平行して多数の混合物のアッセイを含む。典型的には、これらの濃度の1つを、ネガティブコントロール（すなわち、ゼロ濃度の試験物質）として使用する。次いで、化合物の暴露に起因する挙動、表現型、生化学、または生理学などの変化を、ネガティブコントロールと比較して評価することができる。

【0010】

第2の態様では、本発明は、線虫を用いた化学物質の作用様式の決定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の異なる変異線虫のパネルをマルチウェルアッセイプレート
の各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記化学物質とを接触させる工程と、
- (c) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動
の変化、または生物学的変化を検出する工程とを包含する方法を提供する。

【0011】

この方法では、基本的な化合物スクリーニング方法論を拡大して、化学物質の作用様式を決定することができる。例えば、化合物を暴露した蠕虫の性質または特徴の検出／測定およびこの結果と既知のタンパク質において変異を保有する変異蠕虫の性質または特徴との比較によってこれを行うことができる。添付の実施例の実施例4は、CNS分野におけるこの例示を提供する。

【0012】

第3の態様では、本発明は、線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定する方法であって、前記方法は、

(a) 線虫集団をランダム変異誘発に供する工程と、

(b) 1つの変異誘発F1線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、

(c) F1線虫にF2子孫を産生させる工程と、

(d) 前記線虫と前記化合物とを接触させる工程と、

(e) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を検出する工程とを包含する方法を提供する。

【0013】

本発明のこの方法は、事実上、マルチウェル形式で行われる古典的な遺伝子サプレッサースクリーニングである。サプレッサースクリーニングでは、蠕虫の化学物質への暴露によって作製された表現型を抑制する変異の同定を目的とする。抑制変異を保有する蠕虫を、通常、同一の化合物への野生型蠕虫の暴露によって得られた表現型と比較して、化合物の存在下でより多数の「野生型」表現型を示すことを基本として同定する。従って、抑制変異を同定するために、化合物への暴露後に工程(e)において、表現型、生理学、生化学、または挙動の特徴が全く変化しないか少ししか変化しない変異体を有効に調査する。

【0014】

本発明者らが記載するように、マルチウェル形式での遺伝的サプレッサースクリーニングの実行によって得られる多くの利点が存在する。特に、標準的な寒天プレートアッセイと比較して、マルチウェルプレートアッセイを行うにはより少量の化合物しか必要としない。さらに、マルチウェルプレートを液体中で行うので、試験化合物は標準的プレートアッセイより有効に線虫によって取り込まれ、また、液体では化合物は低濃度であるために寒天プレートよりも沈殿が少ない傾向がある。

【0015】

第4の態様では、本発明は、化合物が線虫に対する定義された効果を有する、第1の化合物の効果を調整する化学物質の同定法であって、前記方法は、

- (a) 実質的に同数の線虫をマルチウェルアッセイプレートの各ウェルに分配する工程と、
- (b) 前記線虫と前記第1の化合物とを接触させる工程と、
- (c) 前記線虫とさらなる化学物質とを接触させる工程と、
- (d) 非視覚的検出手段を用いて前記線虫の表現型の変化、生理学的変化、挙動の変化、または生物学的変化を検出する工程とを包含する方法を提供する。

【0016】

この方法を使用して、所与の化合物のアンタゴニストについてスクリーニングすることができる。この原理を、添付の実施例8で例示する。

【0017】

本発明の方法はすべて、マルチウェル形式で行われるので中程度から高速スクリーニングでの使用に適切である。好ましい実施形態では、マルチウェルプレートは96ウェルであるが、本発明はまた、別の数のウェル（6、12、24、384、864、または1536ウェルが含まれるが、これらに限定されない）を有するマルチウェルプレートを適用可能である。用語「マルチウェルプレート」および「マイクロタイタープレート」を、全体にわたって交換可能に使用する。

【0018】

本明細書中に記載の全てのスクリーニング法と同様に、上記の方法を、*Caenorhabditis* 属由来の線虫（特に、*C. elegans*）を使用して行うことが好ましい。*C. elegans* および *C. briggsae* が好ましいが、本明細書中に記載のスクリーニング法を、他の線虫（特に、他の微視的線虫、*Caenorhabditis* 属に属する微視的線虫）を使用して行うことができることが認識される。本明細書中で使用される、用語「微視的」線虫は、成虫段階で *C. elegans* とほぼ同サイズ（1mmオーダーの長さ）の線虫を含む。このおおよそのサイズの微視的線虫は、このようなスクリーニングを行うために当該分野で一般的に使用される型の多ウェルプレートのウェルで容易に成長することができるので、中程度から高処理スクリーニングでの使用に非常に適切である。

【0019】

本発明の全ての方法は、試験化合物の存在下での線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出を必要とする。非視覚的検出手段を使用してこのシグナル（読み出しともいう）を検出することが本発明の方法の本質的特徴である。本明細書中で使用される、用語「非視覚的検出手段」は、ヒトの目での目視検査を必要としない任意のシグナル検出手段をいう。

【0020】

非視覚的検出系の使用は、全体的な表現型または挙動の変化を検出するために、肉眼による線虫の目視検査を必要とする方法を使用して以前から公知のスクリーニング方を超える大きな利点を示す。

【0021】

線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化の結果として発生するシグナルは、例えば、線虫自体が発生させる蛍光、発光、または比色シグナルまたは蠕虫の全懸濁液中の光学密度の変化を含む種々の型であり得る。

【0022】

本方法の1つの実施形態では、シグナルは、試験化合物との接触後に蠕虫に添加されたマーカー分子から発生する。マーカー分子は線虫によって取り込まれ、線虫における化学物質の活性を表現型、生理学、挙動、または生化学の変化の結果としてのマーカー分子の性質の変化に起因するシグナルの検出によって直接または間接的に監視することができる。

【0023】

蠕虫がマーカー分子を取り込むことができる種々の方法が存在する。例えば、蠕虫は、試験化学物質の作用の結果としてマーカーを取り込むことができる。別の可能性は、蠕虫に化学物質の添加前にマーカー分子を予備充填することができるか、蠕虫が培養された培地を介するか蠕虫が摂取する細菌もしくは他の食物粒子を介してマーカー分子を送達させることができることである。

【0024】

あるいは、マーカー分子は、線虫自体の細胞において発現される遺伝子コードマーカーであり得る。トランスジェニック *C. elegans* の日常的な構築法は当該分野で周知であり、適切なプロモーター配列を使用して、全ての細胞（特

に、組織または1つまたは複数の特定の細胞型)において遺伝子コードマーカを発現する*C. elegans*を構築することができる。適切な遺伝子コードマーカ分子には、自己蛍光タンパク質(AFP)(緑色蛍光タンパク質(GFP)および青色蛍光タンパク質(BFP)など)、エクオリン、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、 β グルクロニダーゼ、 β ラクタマーゼ、 β ガラクトシダーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ノパリンシンターゼ、オクタピンシンターゼが含まれる。

【0025】

マーカ分子を、線虫の生化学的活性の結果として線虫に化学的変化を起こすことができる「前駆体」分子として線虫に添加することができる。この前駆体の性質の変化に対する生化学活性によって測定することができるシグナルが発生する。この系の典型的な例は、線虫の腸に存在する酵素によって切断されて検出可能な性質を有するマーカ分子(例えば、蛍光など)を発生させることができる前駆体マーカ分子の使用である。このような前駆体マーカの例には、カルセイニン-AM、エステラーゼによって切断されるフルオレセイン二酢酸(FDA)およびBCECF-AM、アルカリホスファターゼ基質(フルオレセイン二リン酸(FDP)およびAMPPD)、アミノペプチダーゼ基質(CMB-leuなど)、グルクロニダーゼ基質(X-glucなど)が含まれる。

【0026】

マーカ分子を使用して発生するシグナルの測定を補助するために、蛍光消光剤または発光消光剤を使用することができる。例えば、培地中の任意のバックグラウンド蛍光を消光するために培地に消光剤を添加することができ、これにより、線虫の腸由来の蛍光の視覚化をより容易にすることができる。

【0027】

適切な非視覚的検出手段には、マルチウェルプレートリーダーが含まれ、これはマイクロタイターリーダーまたはelisapレートリーダーとしても公知である。マイクロタイタープレートリーダーの使用により、潜在的な薬理学的活性を有する活性な化学物質を選択するための高処理スクリーニングが容易になる。

適切なマルチウェルプレートリーダーは、当該分野で一般的に使用されており、市販されている。蛍光検出、発光検出、比色検出、分光光度検出、免疫化学的検出、放射線検出、および光学密度検出を含む広範な検出法を使用して、このようなプレートリーダーを使用することができる。

【0028】

マルチウェルプレートリーダーの利点は、これを使用して線虫に対する化学物質の活性の結果として発生するシグナルを定量的に測定することができることである。定量的測定を行う能力とは、線虫に対する化合物の活性の定量的用量応答曲線を構築することができることを意味する。この用量応答曲線を使用して、*C. elegans*などの線虫における化合物の IC_{50} および ED_{50} を決定して、至適濃度を決定することができる。さらに、用量応答曲線は、化合物の任意の毒性の同定が可能であり、化合物の可能な第2の標的および副作用の指標ともなり得る。

【0029】

マルチウェルプレートリーダー以外の非視覚的検出系を、本発明の方法に使用することもできる。このような検出系の例は、Union Biometrica, Inc、Somerville、MA、USAから市販されている「線虫ディスペンサー装置」に基づく。この装置は、流動細胞計測器（蛍光表示式細胞分取器（FACS）など）と類似の性質を有する。したがって、これは、一般に、蛍光表示式線虫分取デバイス（FANS）に相当する「FANS」装置ということができる。FANSデバイスは、微視的線虫の性質（サイズ、光学密度、蛍光、および発光など）の測定が可能である。少数の線虫を用いて行われるスクリーニングアッセイ、わずかなシグナルを発するアッセイ、または食物の存在がシグナルの測定に不利であり得るアッセイでは、FANSは好ましい検出装置である。しかし、FANSの使用はこれらの実験条件に限定されず、一般に、FANSは本明細書中に記載の全てのスクリーニング法に使用することができる。

【0030】

FANSデバイスを使用したスクリーニング法は、マルチウェルプレートリーダーについて記載したスクリーニング法と非常に類似している。簡単に述べれば

、蠕虫をマーカー分子を含むか含まない化学物質と接触させる。適当な時間をおいて、マルチウェルプレートを、FANS装置に供して、完全に自動化した手順で蠕虫の特徴（全体のサイズ、蛍光、発光、または光学密度など）についてウェル毎に分析する。次いで、所望の特性を記録する。FANSデバイスを使用して、定量的にスクリーニングを行うこともできる。

【0031】

本発明の方法を使用して定量的結果を得るために、実質的に同数の線虫の各ウェルへの添加を確実にすることが重要であり得る。ウェルに添加された正確な蠕虫数は、行われるスクリーニングの型および必要な感度に非常に依存し得る。96ウェルプレートを含む全てのプレート形式では、ウェルあたり1~100匹、より好ましくはウェルあたり10~80匹、もっとも好ましくはウェルあたり80匹の蠕虫を使用することが好ましい。

【0032】

種々の方法を使用して、実質的に同数の蠕虫の各ウェルへの添加を確実にすることができる。これを行うことができる1つの方法は、固体または液体培地中での当業者に公知の標準的な手順に従って培養した蠕虫の獲得およびこの蠕虫の粘性溶液中への再懸濁による均一な懸濁液の形成である。溶液の粘度により懸濁液中の蠕虫が均一に分散されるので、各ウェルへの同体積の均一な蠕虫懸濁液の添加により実質的に同数の蠕虫を分配することができる。適切な粘性溶液には、低濃度のポリマー材料（例えば、0.25%の低融点アガロース）、グリセロールなどを含む溶液が含まれる。

【0033】

上記のアプローチの代わりとして、マルチウェルプレートのウェルへの蠕虫の均等な分配を、Union Biometrica, Inc. などによって開発された分配デバイスを用いて行うことができる。プレートの各ウェルへの設定数の蠕虫を添加するように蠕虫ディスペンサーをプログラミングすることができる。さらに、これを使用して、雌雄同体もしくは雄または耐性幼虫のみを分配するような方法において蠕虫を選択することができ、特に卵、L1、L2、L3、L4、または成虫の蠕虫を分散させるようなサイズを基本として選択することもで

きる。

【0034】

本発明者らは、本発明の方法での粘性培地の使用は、同数の蠕虫を確実にマルチウェルプレートのウェルに添加するのを超える利点を有し得ることを観察した。本発明者らが記載したマルチウェルスクリーニングを、液体培地中で行う。しかし、*C. elegans*などの線虫の天然の環境は固体（例えば、土壌）であるので、液体培地での成長ではあまり健全な蠕虫が得られない。液体培地で成長した蠕虫は、より長くかつ細く、咽頭ポンプ速度は減少し、蠕虫は運動性が低く、あまり産卵しない。本発明者らは、粘性を増大させるため（すなわち、線虫培養用の通常の液体培地（M9など）よりも高い粘度を得るため）の培地への水溶性ポリマーの添加によりこの問題に対する解決法を見出した。粘性液体培地の使用により、液体培地の利点（すなわち、液体での線虫の取り扱いやすさ）を保持しながら蠕虫の健康が維持される。好ましいポリマー型は、低融点アガロース、カルボキシメチルセルロース、およびポリエチレングリコール（特に、PEG 8000）である。ポリマーの至適添加量を日常的な実験によって同定することができ、これは、アッセイの読み出しの性質に依存して変化し得る。例えば、以下の記載の「運動アッセイ」では、0.3%の培地粘性カルボキシメチルセルロースの添加が最適であることを見出した。本発明者らは、本明細書中に記載のスクリーニングを行うための至適条件を決定するために、カルボキシメチルセルロースのいくつかの粘度変形形態を使用した。1つの実験では、カルボキシメチルセルロースの3つの変形形態（すなわち、Sigma（St. Louis, MO, USA）から入手した低粘度、中程度の粘度、および高粘度のカルボキシメチルセルロース）を、0.3%の濃度で試験した（図11を参照のこと）。この濃度で培地および高粘度カルボキシメチルセルロースはスクリーニングでの最高の結果が得られることが認められた。実用的理由により、中程度の粘度のカルボキシメチルセルロースを使用することが好ましい。約0.3%のカルボキシメチルセルロース濃度が大多数のスクリーニングに適切である。アッセイ培地の粘度を増大させるための水溶性ポリマーの添加により、本明細書中に記載の任意の特異的アッセイ型（咽頭ポンピングアッセイ、運動アッセイ、交配アッセイ、産卵アッ

セイ、および検出アッセイを含む) および事実上マルチウェル (マイクロウェル) プレートで行われる *C. elegans* などの線虫を使用した他の任意のアッセイ型を有意に改良することができる。

【0035】

本明細書中に記載のスクリーニングアッセイを、おそらく培地の粘度の増加に必要とされるよりも低濃度 (線虫がマイクロタイタープレートのウェルに固着を回避するのに十分な濃度) への水溶性ポリマーの添加によって改良することもできる。

【0036】

マイクロタイタープレートの構築に使用した可塑性材料の性質により、一般にこのようなプレートの表面は疎水性である。従って、*C. elegans* などの線虫の外表はマイクロタイタープレート壁に固着する傾向があるので、マイクロタイタープレートで行われるアッセイの性能は著しく妨害される。異なる型のマイクロタイタープレートを使用してこの問題を回避することができるが、現在、この問題を十分に低減するマイクロタイタープレートは市場に存在しない。本発明者らは、線虫がマイクロタイタープレートの壁に固着するという問題を、アッセイ培地への適切な濃度の水溶性ポリマーの添加によって克服することができることを新規に見出した。

【0037】

水溶性ポリマーの好ましい型は、ポリエチレングリコール (PEG) (特に、PEG 8000)、ポリビニルアルコール (PVA)、およびポリビニルピロリドン (PVP) であり、PEG 8000 が最も好ましい。所与のスクリーニングアッセイ型における所与のポリマー型について、培地に添加するポリマーの至適添加濃度を日常的な実験によって容易に同定することができる。PEG 8000 では、0.1% の濃度が、ほとんどのスクリーニング型で良好な結果が得られる。0.01% ~ 10% の範囲のポリマー濃度も適切であり得るが、アッセイ型に依存する。

【0038】

アッセイ培地へのポリマーの添加により、蠕虫のウェルの壁への固着の回避に

よる96ウェルを超えるウェルを有するマルチウェルプレートで行われるアッセイが特に改良される。さらに、培地中のポリマーの存在により、一般に、液体培地中での線虫の操作（ピペッティングおよびFANSデバイス、Genetix (Dorset, UK) のGfit2デバイス、およびマイクロタイタープレートへの充填に使用される他の自動化システムなどの操作）が容易になる。

【0039】

マイクロタイタープレートの壁などの固体表面への線虫の固着を回避するためのアッセイ培地への水溶性ポリマーの添加により、本明細書中に記載の任意の特異的アッセイ型（咽頭ポンピングアッセイ、運動アッセイ、交配アッセイ、産卵アッセイ、および検出アッセイを含む）および事実上マルチウェル（マイクロウェル）プレートで行われる *C. elegans* などの線虫を使用した他の任意のアッセイ型を有意に改良することができる。

【0040】

種々の *C. elegans* 類（野生型蠕虫、選択変異、トランスジェニック蠕虫、およびヒト化蠕虫を含む）を使用して、本明細書中に記載の全てのスクリーニング法を行うことができる。トランスジェニック株は、生物の全体、生物の一部、単一の組織、細胞型のサブセット、単一の細胞型、または生物の1つの細胞において導入遺伝子を発現する株であり得る。変異蠕虫は、単一の遺伝子または2つまたはそれ以上の異なる遺伝子において変異を有し得る。ヒト化蠕虫は、ヒト標的タンパク質に特異的に指向されるが線虫の生物学のすべての利点および操作の容易さを有するスクリーニングを行うために使用することができるので、ヒト薬学的分野における潜在的な治療活性を有する化合物の同定に特に有用である。

【0041】

線虫の標準的な培養法は、Epstein and Shakes, Academic Press, 1995に記載されている。選択した *C. elegans* 遺伝子の変異を有する標準的な変異蠕虫作製法については、例えば、J. Sutton and J. Hodgkin, 「線虫 *Caenorhabditis elegans*」、William B. Wood編、およびCommunit

y of *C. elegans* Researchers CSHL, 1988、594~595; Zwaal et al.、「標的凍結トランスポゾン挿入変異バンクの使用による*Caenorhabditis elegans*の不活化」、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90、7431~7435; Fire et al.、「*C. elegans*の二本鎖RNAによる強力の特異的な遺伝学的干渉」、Nature、391、860~811を参照のこと。蠕虫集団を、EMS、TMP-UV、または照射の使用によってランダム変異誘発に供することができる (Methods in Cell Biology、第48巻、同書)。次いで、所望の遺伝子中に欠失を有する変異蠕虫を選択するために、いくつかのPCR選択ラウンドを行うことができる。さらに、特異的*C. elegans*変異体の範囲を、*C. elegans* Genetic Center、University of Minnesota、St. Paul、Minnesotaから利用可能である。

【0042】

本発明の方法で試験される「化学物質」または「化合物」は、通常蠕虫に存在しないか、蠕虫が通常その生活環の間に暴露されない任意の外来分子であり得る。これらの用語を、交換可能に使用することができる。例えば、蠕虫を公知の薬理学的活性を有する薬局方に列挙の化学物質／化合物に暴露することができる。あるいは、化学物質／化合物は、特定の生化学的経路または遺伝子との相互作用が公知のものであり得る。さらにその代わりとして、こうちの生物活性を有さない公知の分子もしくは全く新規の分子または組み合わせ化学などによって得ることができる分子のライブラリーを試験することである。DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、またはタンパク質である化合物も排除されない。

【0043】

1つの実施形態では、本発明の方法を、「毒性遺伝子」を含む導入遺伝子を発現するトランスジェニック*C. elegans*を使用して行う。この文脈では、用語「毒性遺伝子」は、細胞に対して毒性を示すタンパク質をコードする任意の核酸配列を含む。適切な例には、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物（ハンチングチン）、best黄斑ジストロ

フィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑ジストロフィー産物、またはunc-53遺伝子産物が含まれる。等価の効果を有するアポトーシスまたは壊死に関連するタンパク質をコードする「毒性遺伝子」を使用することもできる。適切な組織特異的または細胞型特異的プロモーターを使用して、単一の組織、細胞型のサブセット、単一の細胞型、または単一の細胞（例えば、単一のニューロン）中の1つまたは複数の毒性遺伝子を発現するトランスジェニック*C. elegans*を構築することができる。毒性遺伝子の発現により、一般に、毒性遺伝子を発現する細胞および組織の異常性／機能障害が得られる。多数の適切な組織、細胞型、または発達特異的プロモーターは、*C. elegans*における使用が公知である。

【0044】

同期化蠕虫培地を使用して、本明細書中に記載の全てのスクリーニング法を行うこともできる。同期化蠕虫は、同一の成長期のものである。*C. elegans*などの線虫の種々の成長期は、卵、L1期、L2期、L3期、L4期、および成虫期である。さらに、本発明の好ましい実施形態では、同期化線虫は、特定の性である。同期化培養物は、雌雄同体もしくは雄または耐性幼虫と呼ばれる特定の幼虫期の線虫であり得る。

【0045】

種々の同期化培養物の作製での使用に適切な技術は当該分野で公知であり、例えば、*Methods in Cell Biology*、第48巻、同書）を参照のこと。標準的*C. elegans*培養物の主な集団は雌雄同体蠕虫からなるので、異なる成長期の同期化雌雄同体線虫を作製するための特別な技術は必要ない。雄蠕虫を作成するために、いくつかの技術が文献中に記載されている。雄が多数であるか、排他的に構成される*C. elegans*培養物は、*C. elegans* II、Fiddle, Blumenthal, Meyer and Pries編、1997、CSHL pressに記載されている。多数であるか純粋な雄サンプルの作製株は、Johnathan Hodgkin, *Worm breeder's gazette*、15 (5)、1999に記載されている。*C. elegans*耐性幼虫を作製するために、いくつかの技術が記載されている（*Elegans* II、同書）。主に、*C. elegans*の温度感

受性 *daf-1* 変異体を使用して耐性幼虫を作製するが、25℃で100%の耐性幼虫を産生させる *daf-2* 変異体などの他の可能性も存在する。

【0046】

本発明の方法の特定の実施形態では、非視覚的検出を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程は、線虫の咽頭ポンピング速度の変化を検出する工程を包含する。これらの方法を、その後集会的に「咽頭ポンピングアッセイ」という。

【0047】

C. elegans は、その食物（例えば、細菌）を含む液体の取り込みによって摂食する。次いで、液体を吐き出し、食物粒子を破碎し、腸内腔に内在化する。この工程を、咽頭の筋肉によって行う。液体の取り込みおよび吐き出しの工程を、咽頭ポンピングまたは咽頭ポンピングと呼ぶ。

【0048】

咽頭ポンピング工程は咽頭筋肉および咽頭ニューロンの両方に関連するので、咽頭ポンピングの測定を利用して、筋肉および／または神経活性に対する効果を有する化学物質を同定するための有用なスクリーニングを得ることができる。

【0049】

蠕虫の腸中のマーカー分子の蓄積の検出によって、咽頭ポンピング速度を容易に測定することができる。マルチウェルプレートリーダーを使用してこれを行う場合、アッセイを迅速且つ定量的に行うことができる。

【0050】

特に、上記のように線虫の腸に存在する酵素によって切断可能なマーカー分子前駆体の使用によって、咽頭ポンピング速度を測定することができる。この目的には、カルセイン-AMが特に好ましい。カルセイン-AMはエステラーゼの基質であり、エステラーゼによるカルセイン-AMの切断の際にカルセイン（蛍光分子）を放出する。エステラーゼは *C. elegans* などの線虫の腸に存在するので、カルセイン蛍光の測定によって咽頭ポンピング速度を直接測定することができる。

【0051】

本明細書中に記載の実施例では、カルセイン-AMを使用して、いくつかの化学物質の存在下または非存在下での *C. elegans* の咽頭ポンピング速度を測定した。これらの測定を定量的高処理法で行って、*C. elegans* 咽頭のポンピング速度を変化させる化学物質を選択することができる。この方法は、カルセイン-AMの使用に制限されず、以下の他の前駆体基質を使用することができる：

ーエステラーゼ基質：カルセイン-AM、FDA、BCECF-AM

ーアルカリホスファターゼ基質：フルオレセインニリン酸 (FDP)

ーエンドプロテアーゼ：アミノペプチダーゼ基質：CMB-leu

発光読み出し

ーアルカリホスファターゼ基質：AMPPD

比色読み出し

ーグルクロニダーゼ基質：X-glucなど。

【0052】

このリストは排他的ではなく、*C. elegans* の腸に存在する他の酵素で切断可能なマーカー分子前駆体 (DNアーゼ、ATPアーゼ、リパーゼ、アミラーゼなど) を見出すか開発することができる。一旦このようなマーカー分子が腸に侵入すると、切断されてその後監視することができる検出可能なマーカーを放出する。したがって、腸中の検出可能なマーカー分子の蓄積の側によって咽頭ポンピング速度を直接測定可能である。

【0053】

C. elegans の腸の pH が低いので、咽頭ポンピング速度の評価には低 pH で蛍光を発する分子が有用である。Molecular probes の LysoSensor green はこの性質を示し、これを首尾よく使用して咽頭ポンピングを評価した。腸で認められる蛍光は類似しているが、カルセイン-AM で得られる蛍光と比較してあまり蛍光を発しない。しかし、低 pH で蛍光を発するマーカー分子は、線虫の食物源 (例えば、細菌) と共に使用することができ、pH の変化のみに依存し、関連する酵素ではないのでその後の読み出しを干渉しないというさらなる利点を有する。

【0054】

LysoSensorマーカー分子またはプローブは、プロトン化の結果として酸性細胞小器官中に選択的に濃縮される弱酸である。このプロトン化はまた、その弱酸側鎖による色素の蛍光消光を軽減する。したがって、LysoSensor色素は、酸性条件下でより多くの蛍光を発する。酸性または中性の範囲（ pK_a 約5.2または約7.5）のいずれかで至適pH感受性である青色蛍光LysoSensor Blueおよび緑色蛍光LysoSensor Greenプローブが利用可能である。その低 pK_a 値を有するLysoSensor Blue DND-167およびLysoSensor Green DNDは、内部酸性区画に存在する場合以外はほとんど蛍光を発しない。

【0055】

構成的にポンピングする咽頭を有する変異*C. elegans*株の使用またはこの表現型も示すトランスジェニック株の使用によって、咽頭ポンピングアッセイを行うこともできる。野生型株または構成的咽頭ポンピング株の使用によって、ポンピング速度を向上、阻害、または調整する化学物質の同定が可能である。

【0056】

線虫*C. elegans*の咽頭は筋肉であり、ポンピング速度は主にいくつかの選択されたニューロンに支配されるので、咽頭ポンピング速度の変化の測定は、神経伝達物質のシグナルおよび筋肉の刺激を研究するための良好なツールである。咽頭ポンピング速度を定量的に測定することができ、このポンピング速度に影響を与える化学物質をスクリーニングする方法を開発したので、本発明は、潜在的な薬理学的活性を有する化学物質のスクリーニングおよび単離法である。

【0057】

咽頭ポンピング速度に影響を与える化学物質は、おそらく一般的な筋肉生物学および／または神経伝達物質経路に対する活性を有する物質である。これらの化学物質の標的であり得るタンパク質の例は、神経伝達物質レセプター（ムスカリンレセプター、グルタミン酸レセプター、ホルモンレセプターおよび5-HTレセプター、カンナビノイドレセプター、アドレナリンレセプター、ドーパミンレセプター、オピオイドレセプター、GABAレセプター、アデノシンレセプター

、VIPレセプター、およびニコチンレセプターなど)、神経伝達物質合成に関与するタンパク質、神経伝達物質放出経路タンパク質、Gタンパク質結合レセプタータンパク質である。さらに、(アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、cAMP応答エレメント結合タンパク質、IP3、ジアシルグリセロール、プロテインキナーゼCホスホリパーゼA~D、ホスホジエステラーゼなど)のGタンパク質結合二次メッセンジャー経路についてのタンパク質、ギャップ結合機能をコードするタンパク質、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関与するタンパク質、イオンチャネルタンパク質、およびイオンポンプタンパク質もまた、このような化学物質の潜在的な標的である。このようなイオンチャネルの例は、ナトリウム/カルシウムチャネル、カルシウムチャネル、ナトリウムチャネル、および塩素イオンチャネルである。一般に、*C. elegans* 咽頭のポンピング速度に影響を与え、且つ咽頭ポンピングスクリーニングを使用して同定される薬物または化学物質は、おそらく以下の活性を示す化合物であろう。

- 神経伝達分子に影響を与えるか神経伝達物質の合成前駆体である分子、
- 神経伝達物質の合成を向上、阻害、または調整する分子、
- 伝達物質を枯渇させる機能を有する分子、
- シナプス間隙中のシナプス小胞からの伝達物質の放出を防止または刺激する分子、
- レセプターのインヒビターまたは刺激因子として機能する分子、
- 伝達のインヒビターまたは刺激因子として機能する伝達分子を模倣する分子、
- 伝達妨害物のアクチベーターまたはインヒビターとして機能する分子、
- ニューロンの興奮後に伝達物質の再取り込みを防止または刺激する分子、
- 偽伝達物質(+/-)として機能する分子、
- レセプター集積を防止または刺激する分子、
- 新規の経路で作用する分子。

【0058】

安薬、精神安定剤、抗癲癇薬、筋肉弛緩薬、鎮静薬、または睡眠薬として治療に使用することができる潜在的な薬理学的活性を有する広範な化学物質をスクリーニングすることができる。このアッセイを使用して、パーキンソン病およびアル

ツハイマー病に有効な化学物質を同定することもできる。さらに、咽頭ポンピングアッセイを使用して鎮痒薬、抗ヒスタミン薬、および抗痙攣薬を単離することもできる。ポンピングアッセイを使用して、抗線虫薬および殺虫剤を同定することもできる。

【0059】

咽頭ポンピングアッセイを使用して、神経伝達経路を調整する化学物質（アセチルコリン、ドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、GABA、およびオクトパミンを含む）同定することもできる。1つまたは複数の上記神経伝達物質レベルの変化を示す選択性変異 *C. elegans* を使用してこれを行うことができる。

【0060】

咽頭ポンピングアッセイを使用すれば、10～15個の作用様式および2～6個の神経伝達経路およびイオンチャネルをスクリーニングできる潜在性がある。阻害と同様に活性化を観察することができるので、このスクリーニング法は、1回のスクリーニングで40～180個の標的のスクリーニングが可能である。

【0061】

上記のスクリーニングに加えて、咽頭ポンピングアッセイ法を、化学物質の作用様式の決定または特異的標的に作用する化学物質の選択に適用することができる。

【0062】

化合物の作用様式を同定するためのスクリーニングを行うために、実質的に同数の定義された異なる変異、トランスジェニック、またはヒト化線虫をマルチウェルアッセイプレートのウェルに分配する。次いで、試験化合物のサンプルを各ウェルに添加し、上記のように咽頭ポンピング速度の変化を検出する。各変異、トランスジェニック、またはヒト化株について、任意の化学物質の非存在下での咽頭ポンピング速度も記録する。従って、咽頭ポンピングアッセイを使用して、定義された変異、トランスジェニック、またはヒト化株における咽頭ポンピング速度を向上させるか抑制する化合物を同定することができる。

【0063】

本明細書中に記載の実施例では、本発明の態様で有用ないくつかの変異およびトランスジェニック *C. elegans* を列挙する。主に、これらの変異体およびトランスジェニックは、神経伝達物質合成、神経伝達物質シグナル伝達、およびイオンチャネルに関する。より詳細には、神経伝達物質レセプター（ムスカリンレセプター、グルタミン酸レセプター、ホルモンレセプター、5-HTレセプター、カンナビノイドレセプター、アドレナリンレセプター、ドーパミンレセプター、オピオイドレセプター、GABAレセプター、アデノシンレセプター、VIPレセプター、およびニコチンレセプターなど）、神経伝達物質合成に関与するタンパク質、神経伝達物質放出経路タンパク質、Gタンパク質結合レセプター経路（アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、cAMP応答エレメント結合タンパク質、IP3、ジアシルグリセロール、プロテインキナーゼC、ホスホリパーゼQなど）、ギャップ結合機能をコードするタンパク質、イオンチャネルタンパク質、およびイオンポンプタンパク質に関する変異、トランスジェニック、およびヒト化蠕虫の例を示す。完全ではないが、本発明のこの態様での使用に適切な周知の変異のリストを、本明細書中の実施例中に示す。

【0064】

このような変異、トランスジェニック、またはヒト化株を使用して、特定の標的に作用する化学物質をスクリーニングして抗精神病薬、抗鬱薬、抗不安薬、精神安定剤、抗癲癇薬、筋肉弛緩薬、鎮静薬、または睡眠薬として治療に使用することができる広範な化学物質を同定することが可能であるだけでなく、このスクリーニングはパーキンソン病およびアルツハイマー病に効果を有し得る化学物質も得られる。さらに、鎮痒薬、抗ヒスタミン薬、および抗痙攣薬を単離することができる。おそらく化学物質の影響を受けることによって本アッセイによって検出することができる伝達物質経路はアセチルコリン、ドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、GSBA、およびオクトパミンの経路である。適切なトランスジェニック、変異、または修飾株を使用して、特異的標的で作用する化合物についてスクリーニングすることが可能であり、殺虫剤および抗線虫薬もまた同定することが可能である。

【0065】

これらの変異、トランスジェニック、およびヒト化蠕虫はまた、十分に定義された生化学的経路で活性を有する化学物質のスクリーニングを開発することができる。例えば、公知の遺伝子または化合物中の選択された変異 *C. elegans* の表現型を向上させる定義された変異を保有する選択された変異 *C. elegans* の表現型を回復する化合物のスクリーニングが可能である。

【0066】

本発明の特に重要な実施形態では、咽頭ポンピングスクリーニングを使用して、潜在的な殺虫活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。本発明者らは、殺虫活性を有する化合物（除草剤、殺虫剤、抗線虫薬、または抗真菌薬など）への *C. elegans* の暴露は、咽頭ポンピング速度に影響を与えることを観察した。これを、咽頭ポンピング法を使用して測定すると *C. elegans* の咽頭ポンピング速度に対する公知の殺虫剤の効果を示す添付の図18～図21に例示する。従って、殺虫活性を有する化合物をスクリーニングするために、咽頭ポンピングスクリーニングを容易に適用することができる。

【0067】

本発明の別の実施形態では、咽頭ポンピングアッセイ法を使用して、線虫に対して定義された効果を有する化合物が作用する生化学的経路の成分をさらに同定することができる。このスクリーニングを使用して、選択された化合物の活性を向上、抑制、または調整する遺伝子の同定が可能である。マルチウェルプレートを使用して何千もの蠕虫を1回でスクリーニングすることができるので、このスクリーニングを直接勝つ迅速に行うことができる。

【0068】

第1に、変異蠕虫の無作為なプールを作製する。変異蠕虫を作製するためのいくつかの技術（EMS変異誘発、TMP-UV変異誘発、または照射変異誘発）が記載されている（*Methods in Cell Biology*、第48巻、同書）。次いで、変異誘発F1線虫をマルチウェルプレートの各ウェルに分配し、ウェル中にF2世代に子孫を産生させる。次いで、線虫に対する公知の活性を有する化合物のサンプルを、F2蠕虫に添加する。咽頭ポンピング速度の変化を上記のように（例えば、マーカー分子またはマーカー分子前駆体の使用）監

視する。

【0069】

咽頭ポンピングに対する化合物の効果を抑制、向上、または調整する変異蠕虫を記録する。これらの変異蠕虫は、化合物によって影響を受ける1つまたは複数の遺伝子の変異を有する。次いで、遺伝学的および分子生物学的技術を使用して変異遺伝子を単離することができる。これらの遺伝子およびその対応するタンパク質は、影響を受けた経路の重要な遺伝子およびタンパク質であると考えられるので、薬物発見肯定におけるさらなるスクリーニング開発用の新規の推定標的である。本明細書中に記載の全ての方法と同様に、好ましくは微視的線虫、特に *Caenorhabditis* 属の蠕虫、最も好ましくは *C. elegans* を使用してこの方法を行う。

【0070】

本発明のさらに別の実施形態では、咽頭ポンピングアッセイ法を使用して、線虫に対して定義された効果を有する選択された化学物質のエンハンサー、サプレッサー、またはモジュレーターである化学物質をスクリーニングすることもできる。

【0071】

このアッセイでは、線虫の咽頭ポンピング速度に対して公知の効果を有する化合物をマルチウェルプレートに置く。次いで、第2の化学物質を各ウェルに添加し、選択された化合物の効果を向上、低減、または調整する化学物質を上記の方法を使用した線虫の咽頭ポンピング速度の変化の検出によって同定する。この方法は、選択された生化学的経路で活性な化学物質のスクリーニングに有用である。従って、単離した化学物質は推定治療薬であるか、さらなる薬物開発の出発物質と考えることができる。

【0072】

咽頭ポンピングアッセイのさらなる実施形態では、*Sarco*/小胞体カルシウムATPアーゼ遺伝子 (SERCA) および/またはそのレギュレーターであるホスホランバン (PLB)、およびサルコリピン (SLN) をトランスジェニック、変異、ヒト化した *C. elegans* を使用してアッセイを行う。これら

の遺伝子は細胞中のカルシウムの内部保存の制御に重要である。

【0073】

これらの変異、トランスジェニック、またはヒト化蠕虫において咽頭ポンピング速度を変化させる化学物質は、SERCA、PLB、またはSLNの活性を変化させるか、SERCA-PLBの内在化を変化させるか、SERCA-SLNの相互作用を変化させるか、SERCA経路の活性を変化させる物質である。このような化学物質は、治療薬として有用であるか、心血管疾患（高血圧、心肥大、および心不全を含む）の領域だけでなく真性糖尿病の領域および骨格筋疾患（プロディー病を含む）の領域のさらなる薬物開発に有用な出発化合物であり得る。

【0074】

咽頭ポンピングアッセイのさらなる実施形態では、異常な咽頭形態学および／または機能を示す線虫を使用してアッセイを行うことができる。

【0075】

線虫の咽頭は、いくつかの細胞型からなり、これらの全ては咽頭が適切に機能するために必要である。さらに、咽頭ポンピングはいくつかのニューロンによって制御されている。咽頭形態学および咽頭機能に必須の細胞は、咽頭筋細胞、咽頭上皮細胞、咽頭腺細胞、および咽頭ニューロンである。これらの細胞型の1つが変化するか、変性するか、機能障害を起こした場合、咽頭は異常な形態学または異常な機能を有するので咽頭ポンピングが変化する。

【0076】

下記の例は、咽頭形態学の変化の結果としてポンピングの変化を示す公知の*C. elegans*変異体を列挙する。さらに、*C. elegans*の咽頭の形態学および／または機能を維持するために必要な1つまたは複数の細胞型の欠失を示す*C. elegans*蠕虫を作製することが可能である。これを、咽頭の細胞中の「毒性遺伝子」の発現によって行うことができる。この文脈では、用語「毒性遺伝子」は、細胞に毒性を示すタンパク質をコードする任意の核酸配列を含む。適切な例には、アタキシン、 α シクレイン、ユビキチン、 τ 遺伝子産物、ハンチントン遺伝子産物、best黄斑ジストロフィー遺伝子産物、年齢関連性黄斑

ジストロフィー産物、またはunc-53遺伝子産物をコードする核酸が含まれる。等価の効果を有するアポトーシスまたは壊死に関連するタンパク質をコードする「毒性遺伝子」を、使用することもできる。適切な発現パターンを指向することができる組織特異的または細胞型特異的プロモーターを使用して、咽頭または咽頭内の特定の細胞型における毒性遺伝子の発現を行うことができる。例えば、myo-2プロモーターを使用して咽頭中の発現を指向し、unc-129プロモーターを使用して咽頭ニューロン中に発現を指向することができる。他の適切なプロモーターには、トロポミオシンプロモーターtmy-1およびdaf-7プロモーターが含まれる。咽頭の1つまたは複数の細胞型または咽頭ニューロン中の毒性遺伝子の発現により、咽頭の形態学および／または機能が変化し、それにより咽頭ポンピング速度が変化する。興味深いことに、daf-7プロモーターの調節下での毒性遺伝子の発現によるASIニューロンの破壊により、耐性幼虫が形成される。これはインスリンの欠乏の結果であるので、ASIニューロンを破壊した*C. elegans*を使用して糖尿病との関連付けに有用であるスクリーニングを行うことができる。下記の咽頭ポンピングアッセイの読み出しまたは運動アッセイの読み出しを使用してこれらのスクリーニングを行うことができる（実施例12を参照のこと）。

【0077】

咽頭ポンピング速度の変化を示す変異またはトランスジェニック蠕虫を使用して、咽頭ポンピング速度を変化させる（例えば変異／トランスジェニック表現型を回復させるか変異／トランスジェニック表現型を向上させる）化学物質をスクリーニングすることができる。従って、単離した化学物質は、抗鬱薬、抗精神病薬、抗不安薬、精神安定剤、抗癲癇薬、筋肉弛緩薬、鎮静薬、抗片頭痛薬、鎮痛剤、または睡眠薬などの治療薬または疾患領域のさらなる薬物開発の出発化合物として有用であり得る。さらに、咽頭／咽頭ニューロンの細胞中に発現する毒性遺伝子の性質の変化によって、パーキンソン病、アルツハイマー病、ローリー病、Best黄斑ジストロフィー、年齢関連性黄斑ジストロフィー、およびポリグルタミン誘導性疾患（ハンチントン病、ケネディー病、および運動失調など）の治療法開発に有用な化学物質を単離することができる。さらに、咽頭ポンピング

速度の変化を示す変異またはトランスジェニック蠕虫を使用して、除草剤、殺線虫薬、殺虫剤、および抗真菌薬などの農薬をスクリーニングすることができる。

【0078】

アッセイ培地の粘度を増大させるためのアッセイ培地への水溶性ポリマーの添加によって本明細書中に記載の咽頭ポンピングアッセイの能力を改良することができる。好ましいポリマー型は、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール（特に、PEG8000）、および低融点アガロースである。任意の所与のポリマー型および咽頭ポンピングアッセイ型について、培地に添加した至適濃度のポリマーを、日常的な実験によって同定することができる。添付の図14および図15に例示のように、アッセイ培地の粘度を増大させるためのポリマーの添加により、*C. elegans*の咽頭ポンピングが増大する。これは、より粘性の高い培地を使用するほど*C. elegans*が自然界で生息する固体条件により近づけることができると考えられる。

【0079】

線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度の水溶性ポリマーのアッセイ培地への添加によって、咽頭スクリーニングの能力を改良することもできる。好ましいポリマー型は、ポリエチレングリコール（PEG）（特に、PEG8000）、PVA、およびPVPであり、PEG8000が最も好ましい。所与の任意のポリマー型および咽頭ポンピング型における所与のポリマー型について、日常的な実験によって至適濃度のポリマーを培地に容易に同定することができる。0.1%の濃度のPEG8000が特に好ましい。

【0080】

本発明者らは、咽頭ポンピングアッセイにおけるアッセイ培地へのPEGの添加により、主に個体の死滅するか損傷を受けた個体数の減少による質が向上することを観察した。アッセイの準備中に、手動または自動化システムのいずれかを使用して異なるウェルおよびプレートに線虫を分配する必要がある。これらの線虫の操作中には、線虫がピペットまたは他のツールに固着するリスクが存在する。線虫が懸濁している培地の流動により、蠕虫が死滅する。培地へのPEG8000の添加により、咽頭ポンピングアッセイにおいてポンピングが増加し、変形

が減少すると結論付けることができる（図10を参照のこと）。

【0081】

本発明のさらなる実施形態では、非視覚的検出手段を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程には、線虫細胞中のイオン、代謝産物、または二次メッセンジャーの細胞内レベルの変化を検出する工程を包含する。

【0082】

本発明のこの特定の実施形態では、化学物質の活性を、マーカー分子由来のシグナルの測定によって間接的に検出するのではなく、特異的イオン、代謝産物、または二次メッセンジャーの存在下で性質を変化させた遺伝子コードセンサーの活性の測定によって検出する。例えば、 Ca^{2+} の細胞内レベルを、遺伝子コードカルシウムセンサー分子GFP-カルモジュリンまたはエクオリンを使用して検出することができる。GFP-カルモジュリンは、カルシウムイオンの存在下で蛍光を発することが公知である。従って、細胞内カルシウムレベルが低い場合は蛍光を検出することができないが、カルシウムレベルが増加した場合、カルシウムはGFP-カルモジュリンと結合して高次構造の変化を生じ、例えばマルチウェルプレートリーダーを使用して検出することができる蛍光分子が得られる。二次メッセンジャー（cAMP、ジアシルグリセロール、またはイノシトール三リン酸（IP3）など）の存在下で蛍光または発光性を変化させた他の遺伝子コードセンサー分子を使用することができる。

【0083】

好ましくは、本発明のこの態様を、全細胞、特異的組織、または選択された細胞中で遺伝子コードセンサーを発現するトランスジェニック*C. elegans*を用いて行う。これを、適切な活性を有する組織特異的または細胞型特異的プロモーターを使用して行うことができる。カルシウムシグナル伝達に感受性を示す線虫の任意の細胞／組織（咽頭、陰門筋、体壁筋、およびニューロンを含む）中でGFP-カルモジュリンを発現するトランスジェニック蠕虫を使用してこの方法を行うことができる。先の例として、トランスジェニック蠕虫は野生型、トランスジェニック、またはヒト化株であり得る。

【0084】

咽頭細胞の細胞内カルシウムレベルは、咽頭ポンピング速度と相関し、これらの細胞中のGFP-カルモジュリンを発現するトランスジェニック線虫において検出される蛍光は咽頭ポンピングの指標であり、また、これらのトランスジェニック蠕虫を使用して咽頭のポンピング速度に影響を与える化学物質をスクリーニングすることができる。

【0085】

本発明のさらなる実施形態では、非視覚的検出を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程は、線虫の運動性の変化を検出する工程を包含する。

【0086】

液体培地に存在する線虫は、培養の間中おおよそ一様な（均一の）分配を維持するような方法で運動する。運動性が不完全な線虫は、液体培地の底の沈殿する。線虫の運動表現型の結果としての線虫のこの特徴のために、運動する線虫と運動しない線虫との間の相違の監視および検出が可能である。

【0087】

線虫の運動性は、主に体壁筋の作用の結果であり、ニューロンの活性によって制御される。従って、筋肉および／またはニューロン活性に対する効果を有し得る化学物質を同定するための運動性の変化の検出に基づくスクリーニングを開発することができる。

【0088】

進歩したマルチウェルプレートリーダーは、マルチウェルプレートのウェルの小領域を検出することができる。このプレートリーダーの使用によって、マルチウェルプレートのウェルの選択された表面領域の測定が可能である。ウェルの中央のみが測定されるように測定領域を中心に集める場合、線虫の自己蛍光（いかなる外部マーカー分子の非存在下でも発生する蛍光）または光学密度を、運動性が不完全な線虫を含むウェルと比較して正常に運動する線虫を含むウェル中で観察することができる。正常に運動する線虫を含むウェルでは、低レベルの自己蛍光または光学密度が認められる一方で、運動性が不完全な線虫を含むウェル中で

は高レベルの自己蛍光または光学密度が認められる。当該分野で周知の血小板凝集アッセイの変形形態を使用して、光学密度を測定する。DyneX (USA) のMRX暴露デバイスを使用して、ウェルあたり複数のポイントで線虫の沈殿パターンを示す光学密度を測定することができる。

【0089】

運動性アッセイの適用では、ウェル表面の2つの領域（一方はウェルの中央での測定および他方はウェルの縁での測定）で自己蛍光または光学密度の測定を行うことができる。ウェルの中央だけでなくウェルの縁をさらに測定してさらなる調節およびいくらかより明白な結果が得られるので、2つの測定の比較により類似の結果が得られる。

【0090】

上記の咽頭ポンピングアッセイと同様の目的のために運動性アッセイを行うことができる。すなわち、運動性アッセイを使用して線虫の運動性を変化させる化学物質を同定することができるので、化合物の遺伝子エンハンサー、サプレッサー、またはモジュレーターの同定用の筋肉および／またはニューロン活性に対する効果を有し得る。線虫の運動性に対する効果を有することが運動性アッセイを使用して同定された化学物質（表10にまとめた）は、一般に、CNS関連薬のクラスに属することだけでなく、GABAアンタゴニスト、NMDAアンタゴニスト、m-Gluアンタゴニスト、およびアドレナリンアンタゴニストも含まれることが見出された。

【0091】

運動性アッセイは、運動している線虫が培地中で懸濁されたままである一方で運動しない線虫はウェルの底に沈むという原理に基づく。上記のように、線虫の位置の違いにより、ウェルの中央で測定した場合にODが異なる。運動している線虫は培地中で希釈されたままであるが、重力の影響により長い時間をかけて沈殿する傾向がある。

【0092】

本発明者らは、培地の粘度を増大させるために液体培地へのポリマーの添加を用いてこの問題を克服することができることを観察した。粘度の増大により、運

動している蠕虫に対する耐性をさらに増大させて培地中より良好に懸濁させることができる。本発明者らは、カルボキシメチルセルロースの低粘度、中程度の粘度、および高粘度の変形 (Sigma, St. Louis, MO, USA (上記)) を試験して、運動アッセイの最適条件を決定した。0.3%の濃度の培地粘性カルボキシメチルセルロースが最適であると決定した。しかし、この結果は、カルボキシメチルセルロースに制限されず、水溶性ポリマー (例えば、低融点アガロース、PEGなど) を使用して運動性アッセイに類似の改良を達成することができる。勿論、任意の所与のアッセイで使用した正確なポリマー濃度は、実行が望まれる特定の型のアッセイに依存し、ポリマー濃度が非常に低い場合は培地粘度が不十分であり、ポリマー濃度が非常に高い場合はゲルを形成して、アッセイ中に運動しない蠕虫が沈まなくなる。任意の所与のポリマー型およびアッセイ型では、アッセイの至適な実行に必要なポリマー濃度を、日常的な実験で容易に決定することができる。

【0093】

比較研究において種々の *C. elegans* 変異体についての運動性アッセイにおける粘度の効果を同定し、その結果を図12および図13に例示する。この研究では、運動性に欠陥を有する *C. elegans Unc* および *Ace* 変異体を、M9培地および粘度の異なる培地において互いに及び野生型 *C. elegans N2* と比較した。この実験結果は、高濃度のカルボキシメチルセルロース培地が運動性アッセイを改良することを例示する。

【0094】

線虫のマルチウェルプレートのウェルへの固着を回避するのに十分な濃度に水溶性ポリマーをアッセイ培地に添加することによって、本明細書中に記載の運動性アッセイの能力をさらに改良することができる。好ましいポリマー型は、ポリエチレングリコール (PEG) (特に、PEG8000)、PVA、およびPVPであり、PEG8000が最も好ましい。所与の任意のポリマー型および運動性アッセイ型について、培地に添加するポリマーの至適濃度を日常的な実験によって容易に同定することができる。PEG8000では、0.1%の濃度が特に好ましい。

【0095】

本明細書中に記載の他のスクリーニング法と同様に、好ましくは微視的線虫、特に *Caenorhabditis* 属の蠕虫、最も好ましくは *C. elegans* を使用して運動アッセイ法を行うことが好ましい。異なる成長期で同期化した蠕虫培養物を使用するか、雄、雌雄同体、または耐性幼虫を使用するか、変異、トランスジェニック、またはヒト化蠕虫を使用して運動性アッセイを行うことができる。1つの変異 *C. elegans* 株である *ace-1*、*ace-2* 二重変異体は、運動性アッセイでの使用に特に有用である。この株は、いかなる運動性も示さず、痙攣様表現型を有する。従って、これを使用して、不完全な運動表現型を回復する化学物質をスクリーニングすることができる。これらの化学物質は、筋肉および／またはニューロン活性に対する薬理学的効果を有し得る。

【0096】

本発明のさらなる実施形態では、非視覚的検出を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程は、線虫の交配挙動の変化を検出する工程を包含する。

【0097】

C. elegans などの線虫の交配挙動は、非常に複雑であり、少なくとも以下の工程が含まれる：バックリング、尾の湾曲、陰門の位置、および交尾。この挙動を示すために、雄線虫は、交配構造に関連する少なくとも41個の特別の筋肉細胞、79個のさらなるニューロン、36個のさらなるニューロン支持細胞、23個の肛門細胞、および16個の皮下組織細胞を有する。いくつかのニューロンの機能が記載されている。交配挙動が不完全ないくつかの変異体も記載されている (*C. elegans* II 同書、J. Sulton et al., W13 G, 7 (2)、22; Loer and Kenyon, WBG, 12 (2)、80, 1992; Hadju et al., International worm meeting abstract, 151, 1991)。交配挙動の複雑な性質のために、*C. elegans* の交配挙動を向上させるためのいくつかの条件および変異体が記載されている。これらのうちの1つは、成虫期に麻酔された挙動を示す *unc-52* (e444) などの運動性が減少した雌雄同体の使

用である。

【0098】

交配には、筋肉およびニューロンの両方の活性が関与するので、線虫の交配挙動の変化の検出に基づくスクリーニング（交配アッセイ）を使用して、筋肉および／またはニューロンの活性を調整することができる化学物質を同定することができる。交配アッセイを使用して、交配を調整する化学物質を単離するか、交配挙動にもたらす化合物の活性を調整する化学物質を単離するか、交配挙動において活性である遺伝子および経路を単離するか、交配挙動に影響を与える化合物の活性を調整する遺伝子および経路を単離することができる。言い換えれば、上記の咽頭ポンピングアッセイおよび運動性アッセイと全く同一の目的に交配アッセイを使用することができる。

【0099】

C. elegans は、液体培地中で交配することができない。従って、半固体条件下で、交配挙動に基づく高処理スクリーニングを行うことができる。この目的には約0.5%の低融点アガロース溶液が適切である。この半固体培地により、線虫は互いに移動して交配するのに十分に支持される。交配アッセイで適切な粘度の培地を獲得するための他のポリマーの添加も使用することができる。

【0100】

交配実験由来の卵または子孫の産生数の測定によって、交配能力を測定する。本発明の特定の実施形態では、自家受精によって子孫を産生することができない特異的株を使用する。このようないわゆる雌雄同体「非自殖」は、子孫を産生しないが、交配した雌雄同体は、子孫を産生する。上記の運動性試験によって子孫を直接測定するか、上記の咽頭ポンピングスクリーニングを行うことができるようにカルセイン-AMなどの色素を培地に添加することができる。あるいは、特異的抗体および蛍光抗体を使用して、子孫を検出することができる。卵、L1期、L2期、L3期、またはL4期の蠕虫のみを認識する任意の特異的抗体は子孫のみを認識し、例として、*C. elegans* L1幼虫の表面上の抗原を認識する抗体が、Hemmer et al., 1991, *J. Cell Biol.*, 115 (5), 1237~47に記載されている。最後に、各ウェル中の卵

または子孫の数を、FANSデバイスを用いて直接計数することができる。

【0101】

本発明の別の実施形態では、雄蠕虫または雌雄同体蠕虫は、自己蛍光タンパク質（GFPまたはBFP）などのマーカー分子またはいくつかまたは全ての細胞型中の蛍光マーカーを安定に発現するトランスジェニック蠕虫であり得る。これらのトランスジェニック蠕虫の交配によって産生された子孫もまたマーカー分子を発現するので、マルチウェルプレートリーダーまたはFANSデバイスを使用して容易に測定することができる。雄蠕虫がマーカーを発現するトランスジェニック蠕虫である場合、雄および雌雄同体の交配に起因する子孫のみがマーカーを発現し、雌雄同体の自家受精から産生された子孫はマーカー分子を保有しないので、雌雄同体は「非自殖」である必要が無い。したがって、交配および自家受精に起因する子孫を、区別することができる。雌雄同体蠕虫はマーカー分子を発現するトランスジェニック株である場合、雌雄同体株はまた「非自殖」株であることが好ましい。

【0102】

交配挙動に関連する雄特異的ニューロンが破壊されている*C. elegans*を使用して、交配アッセイを行うこともできる。本明細書中に含まれる例により、交配挙動に関連する特異的ニューロンのリストが得られる。例えば、咽頭ポンピングアッセイに関する上記の1つの毒性遺伝子発現によって、1つまたは複数のこれらのニューロンの機能を破壊することができる。1つまたは複数の特異的ニューロンが欠損した*C. elegans*の使用によって、特異的ニューロンシグナル伝達経路に作用する化学物質を同定するためのスクリーニングが可能である。このようなスクリーニングを使用して同定した化学物質は、CNS関連薬理学的活性を有し得る。

【0103】

特異的組織または細胞型における毒性遺伝子の発現の結果として交配挙動の変化を示すトランスジェニック*C. elegans*を使用して、交配アッセイを行うこともできる。適切な組織または細胞型特異的プロモーターの調節下で上記の毒性遺伝子の1つを使用した当該分野で公知の標準的技術に従って、適切なトラ

ンスジェニック *C. elegans* を構築することができる。この目的に有用であり得るプロモーターには、CP9での遺伝子に発現を指向する *her-1* P2プロモーター、*ray6*での遺伝子発現を指向する *mab-18* (*pax-6* ホモログ *vab-3*での遺伝子発現を指向する) プロモーター、受精囊の60個の細胞中の遺伝子発現を指向する *spe-T1* プロモーターが含まれる。

【0104】

本発明のさらなる実施形態では、非視覚的検出を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程は、線虫の産卵挙動の変化を検出する工程を包含する。

【0105】

雌雄同体 *C. elegans* 線虫の陰門は、少なくとも24個の細胞および数個のニューロンを含み、そのうちHSNニューロンは産卵に最も重要であると考えられている。さらに、少なくとも8個の子宮筋肉を記載した。生殖腺発達、産卵、陰門発達、および機能におけるいくつかの変異体が記載されている（線虫 *Caenorhabditis elegans*、同書；*C. elegans* II、同書）。

【0106】

従って、*C. elegans* などの線虫の産卵挙動の変化の検出に基づいた読み出しを使用する高処理スクリーニングアッセイを開発することができる。また、本明細書中に記載の咽頭ポンピングおよび運動性アッセイと同一の目的で、産卵の検出に基づくアッセイを使用することができる。このアッセイでは、上記の交配アッセイ技術を使用して得られた子孫数の計数によって産卵数を検出する。

【0107】

産卵アッセイおよび交配アッセイは、卵および子孫の測定に基づく。一定の実施形態では、卵への特異的抗体の適用および当該分野で公知の卵を認識する抗体に特異的な色素での対比染色によって、卵の量を測定することができる。さらなる実施形態では、この方法は、卵殻を認識する特異的色素を使用して産卵数を検出する工程を包含する。1つの特定の実施形態では、卵の孵化の際に放出される物質を認識する色素を使用して、ウェル中の卵数の検出を行う。孵化工程の間に

、酵素キチナーゼが培地に放出される。酵素は、蛍光前駆体分子である基質 4-メチルウンベリフェリル 2-D-N, N, N, -トリアセチルキトトリオシド (または 4-メチルウンベリフェリル β -D-N, N'-ジアセチルキトピオシド) (Sigma, St. Louis, MO から市販) を認識する。合成基質 4-メチルウンベリフェリルトリアセチルキトトリオシドの加水分解後にマイクロタイタープレートリーダー中の遊離 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を測定する。キチン部分に連結した色素を含むか、発光、蛍光、または有色色素であり得る他の基質を、このようなスクリーニングで使うことができる。この例は、Molecular Probes, Eugene, OR または Sigma から市販されている N-アセチル-2-グルコサミニドまたは CM-DCF-NAG である。キチナーゼ基質を用いた産卵アッセイを以下の一般的方法を使用して行うことができる。マイクロタイタープレート中の 80 μ l の M9 培地に 30 匹の線虫を置く。10 μ l の適切な濃度の試験化合物を添加する。10 μ l の適切な濃度のキチナーゼ基質を添加する。蛍光、発光、または色素の形成を種々の時間間隔で測定する。典型的な実験結果を、図 16 および図 17 に示し、これは、時間間隔が増加するほど良好な読み出せることを明白に示している。

【0108】

本発明のさらに別の実施形態では、非視覚的検出を使用した線虫の表現型、生理学、挙動、または生化学の変化を示すシグナルの検出工程は、線虫の排泄挙動の変化を検出する工程を包含する。

【0109】

筋収縮の常同性配列の周期的活性化によって、C. elegans などの線虫の排泄を行う。これらの収縮は、前側の体壁筋から開始される。前側の体の収縮頂点で、4つの肛門筋も収縮する。4つの肛門および腸筋は2つの腸筋、肛門下制筋、および肛門括約筋である。この一連の筋収縮に加えて、運動ニューロン AVL および DV B を含む特異的ニューロンもまた、排便の制御に関連する。排泄には筋肉およびニューロンの両方の活性が必要であるので、C. elegans などの線虫の排泄挙動の変化の検出に基づく読み出しを使用する高処理スクリーニングアッセイを開発することができる。また、本明細書中に記載の咽頭ポンピ

ングおよび運動性アッセイと同一目的に、排泄の検出に基づくアッセイを使用することができる。

【0110】

不完全な排泄挙動を有する*C. elegans*変異体（特に、便秘している*C. elegans*変異体）を使用して、排泄アッセイを行うことが好ましい。排泄周期における全ての欠損を有するいくつかの変異体が報告されている（Thomas、Genetics、124、855～872、1990；Iwasaki et al.、PNAS、92、10317～10321、1995；Reiner et al.、Genetics、141、961～976、1995）。しかし、排泄インヒビターである化合物をスクリーニング可能な野生学蠕虫または排泄欠損を含まない蠕虫を使用して、排泄アッセイを行うこともできる。*C. elegans*の排泄には筋肉およびニューロンの活性が必要であるので、排泄速度を変化させる化合物は、CNS関連薬理学的活性を潜在的に有し得る。

【0111】

pHに感受性を示すマーカー分子（例えば、蛍光マーカーBCECF）を使用して、*C. elegans*などの線虫の排泄速度を容易に測定することができる。マーカー分子を、それ自体が蛍光を発しない前駆体BCECF-AMの形態で*C. elegans*の腸に充填することができる。BCECF-AMをマルチウェルプレートのウェル中の培地に添加する場合、蠕虫は化合物を取り込んで*C. elegans*の腸に存在するエステラーゼによって切断されてBCECFを放出する。BCECF蛍光は、pH感受性であり、*C. elegans*の腸の比較的低いpH条件下（pH6未満）で化合物は全く蛍光を発しないか非常に低い蛍光を示す。排泄工程の結果として、*C. elegans*の腸よりも高いpHを有する培地にBCECFが放出されるので、BCECFは蛍光を発する。従って、培地中のBCECF蛍光レベル（Ex/Em=485/550に設定したマルチウェルプレートリーダーを使用して測定）は、線虫の排泄速度の指標である。

【0112】

アスピリンなどの芳香基の存在下でテルビウムなどのランタニドのキレート化

の発光特性に基づく方法を使用して、排泄を測定することもできる。この方法は2つの予備充填工程（第1に、マルチウェルプレートのウェルを、（線虫の添加前に）DTPAなどのキレート剤に結合させたアスピリンを予備充填し、第2に当該分野で公知の標準的な技術を使用して細菌または他の線虫食物源粒子を予備充填する）を必要とする。次いで、DTPAなどのキレート剤を結合させたアスピリンで*C. elegans*を予備充填し、テルビウムを予備充填した細菌を与える。

【0113】

ウェルに添加した予備充填細菌中に存在するテルビウムにより、バックグラウンド発光レベルが低下する。線虫が細菌を摂取する場合、細菌成分は消化されるが、テルビウムは培地中で純化される。次いで、遊離テルビウムを、ウェル中に予備充填したアスピリンによってキレート化されて測定可能な発光が得られる。したがって、認められた発光は、線虫排泄の指標である。

【0114】

さらなる排泄検出法は、ランタニドのエステル化キレート剤に基づく。この方法は、テルビウムのアスピリンキレート化によって排泄を検出する上記の方法と本質的に類似している。ランタニドキレート化法の主な利点は、キレート剤でウェルを被覆するのではなく、線虫を入れた液体培地に添加することができることである。

【0115】

ランタニドは、芳香基の存在下でキレート化された場合、寿命の長い蛍光を示すことが公知の希土類金属である。周知のランタニドはユーロピウムおよびテルビウムであり、典型的なキレート剤はジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）である。アッセイは、エステル化DTPAはテルビウムをキレート化できないという原理に基づく。*C. elegans*による消化後、このようなエステル化キレート剤は、腸エステラーゼで処理される。従って、排泄による放出の際、テルビウムを容易にキレート化するので、当該分野で公知の時間分解蛍光を使用して検出可能である。この方法は、非常に少量の物質の検出が可能である。短いインキュベーション時間に適用する場合、この方法により排泄工程の欠損の監視が可

能である。

【0116】

添付の図面と共に以下の実施例を参照して、本発明がさらに理解される。

【0117】

実施例1：線虫の分配および化合物の希釈。本発明の方法を使用したスクリーニングの基本的実行プロトコルは、96ウェルを有するマルチウェルプレートについて記載しているが、他のウェルプレート（6、12、24、384、または1536ウェル）も使用することができる。

【0118】

好ましくは、同期化蠕虫を使用する。大量の同期化蠕虫集団は、*Method in Cell biology*、第48巻、同書に記載されている。蠕虫を好ましい時期まで成長させた後、その後使用する前にM9緩衝液で洗浄し、アッセイ緩衝液（40mM NaCl、6mM KCl、1mM CaCl_2 ）に再懸濁した。（10×M9緩衝液：30g KH_2PO_4 、60g Na_2HPO_4 、50g NaCl、10ml MgSO_4 を H_2O で1リットルにメスアップ）。M9緩衝液以外の他の緩衝液も、この目的に適切であり得る。

【0119】

次いで、蠕虫を希釈して半軟寒天（最終濃度が0.25%の低融点アガロースを含むM9緩衝液）に再懸濁する。この手順により、均一で安定な蠕虫懸濁液が得られる。低融点アガロース以外の他のポリマーもこの目的に使用することができる。均一な蠕虫懸濁液の存在により、マルチウェルプレート中の蠕虫の等しい分配が容易になるが、これは記載のスクリーニングアッセイには重要ではない。ウェル上で均一な線虫の分布が得られる任意の他の方法も有用である。より詳細には、蠕虫ディスペンサーの使用がさらに良好であり、マルチウェルプレートのウェル上により均一に蠕虫が分配される。

【0120】

電子8チャンネルピペットを使用して、マルチウェルプレートに蠕虫を分配する。この実験の好ましい設定では、40±5匹の蠕虫をマイクロタイタープレートの各ウェルに添加する。

【0121】

化学物質をDMSO中に溶解する。任意の他の溶媒をこの目的に使用することができるが、選択したほとんどの化学物質は、DMSOに溶解するようである。種々の濃度の化学物質をウェルに添加するが、最も明白な結果が得られるように $3\mu\text{M}$ と $30\mu\text{M}$ との間の濃度を選択することが好ましい。化学物質濃度を $1\mu\text{M}$ 未満～ $100\mu\text{M}$ に変化させることによって用量効果のスクリーニングが可能である。DMSO濃度は高すぎるべきではなく、好ましくは1%を超えるべきではなく、より好ましくはDMSO濃度は0.5%を超えるべきではなく、さらにより好ましくはDMSO濃度は0.3%より低い。

【0122】

実施例2：咽頭ポンピングアッセイ条件。所望される特異的アッセイに依存して、異なる*C. elegans*株を使用することができる。一般に、*C. elegans*の咽頭のポンピング速度を阻害する化学物質を選択するためのスクリーニングを、構成的にポンピングする咽頭を有する変異*C. elegans*株を用いて行う。野生型蠕虫もこの目的に使用することができるが、変異蠕虫が好ましい。ポンピングのインヒビターを選択するために、他の*C. elegans*変異体をこのスクリーニングで使用するすることができる。構成的にポンピングする咽頭を有する選択された変異*C. elegans*は、一定の速度で腸に培地をポンピングし、この表現型の減少／回復を容易に記録することができ、化学物質の検出および選択が容易である。

【0123】

*C. elegans*咽頭ポンピングを向上させる化学物質を選択するために、一般に、野生型*C. elegans*蠕虫を使用してスクリーニングを行うが、他の変異体をこのスクリーニングに使用することができる。食物源は咽頭ポンピングを誘導するためのシグナルの1つであるので、いかなる食物源も含まない液体培地中で野生型蠕虫はポンピングしないかポンピングが減少する。野生型蠕虫は、このアッセイでポンピング速度が減少し、ポンピング速度の向上を容易に記録することができる。

【0124】

培地へのカルセイン-AMなどのマーカー分子前駆体の添加および*C. elegans*腸中のマーカー色素の形成の測定によって咽頭ポンピング速度を直接測定する。カルセイン-AMを、*C. elegans*の腸に存在するエステラーゼによって切断し、蛍光分子であるカルセインを放出させる。どの程度の培地が蠕虫の腸に侵入し、どの程度のカルセイン-AMが蠕虫の腸に侵入するのかを、咽頭ポンピング速度によって同定する。したがって、線虫の腸中の蛍光で検出可能なカルセインの蓄積の測定によって、咽頭のポンピング速度の決定が可能である。

【0125】

咽頭ポンピング速度を変化させる化学物質により、カルセイン-AMがいくらか取り込まれるので、幾らかの蛍光シグナルが得られる。さらに、マルチウェルプレートリーダーを使用して蛍光を迅速且つ定量的に測定することができるので、潜在的な薬理学的活性を有する化学物質同定用の迅速で定量的な高処理スクリーニング法が得られる。

【0126】

カルセイン-AMを用いた咽頭ポンピングスクリーニングを行うために、 $1\mu\text{M}$ と $100\mu\text{M}$ との間の濃度のカルセイン-AMを培地に添加する。 $5\sim 10\mu\text{M}$ のカルセイン-AMを使用するのが好ましい。以下の設定： $E_x/E_m=485/530$ のマルチウェルプレートリーダー（Victor 2、Wallac Oy、Finland）を使用して、蛍光を測定する。

【0127】

マーカー分子の蓄積の検出によるこの咽頭ポンピング速度の測定は、カルセイン-AMに限定されない。他の手順を使用することができるので、本明細書中に記載のアッセイを他の手順に適切に変更することができる。前駆体をエステラーゼで切断することができるが、これは、線虫の腸中の他の酵素の基質であってもよい。さらに、マーカー分子は、蛍光分子である必要は無いが、他の方法で検出可能な分子であり得る。これらの前駆体物質のほとんどが市販されているか、当該分野で公知の方法により合成することができる。いくつかの例を以下に示す。

蛍光読み出し

ーエステラーゼ基質：カルセインーAM、FDA、BCECF-AM、

ーアルカリホスファターゼ基質：フルオレセインニリン酸(FDP)、

ーエンドプロテアーゼ：アミノペプチダーゼ基質：CMB-leu、

発光読み出し

ーアルカリホスファターゼ基質：AMPPD、

色素読み出し

ーグルクロニダーゼ基質：X-gluc。

【0128】

基質を見出すか発生させることができる腸に存在する他の標的酵素は、DNAアーゼ、ATPアーゼ、リパーゼ、およびアミラーゼである。種々のマーカー分子（主に蛍光）の概要は、「蛍光プローブおよび実験化合物ハンドブック」、*molecular probes*、R. P. Haugland編に見出すことができる。

【0129】

実施例3：薬局方由来の化合物を用いた咽頭ポンピングアッセイ試験。薬局方から選択した160種の周知の薬物をスクリーニングで使用して、咽頭ポンピング法の能力を試験した。試験した薬物は、種々のカテゴリーに属し、鎮痛剤、抗糖尿病薬、抗不整脈薬、カルシウムチャネル遮断薬、利尿薬、コリンエステラーゼインヒビター、プロトンポンプインヒビター、および抗鬱薬が含まれる。

【0130】

2つの96ウェルマルチウェルプレートに薬物を無作為に分配した。*C. elegans*咽頭のポンピング速度を、実施例2に記載のようにカルセインーAMを使用して測定した。*C. elegans*野生型N2株を使用して、ポンピング表現型のエンハンサーを選択し、構成的にポンピングする咽頭を有する変異*C. elegans*株を使用して、ポンピングのインヒビターを検出した。

【0131】

第1のアッセイでは、基質カルセインーAMを蠕虫および化合物と同時に培地に添加した。約1時間後に蛍光を測定した。

【0132】

このプロトコールの変形形態では、最初に化合物および蠕虫を培地に添加して約1時間インキュベートする。化学物質が咽頭のポンピング速度を活性化または阻害させるこのインキュベーション期間後、カルセイン-AMを添加した。次いで、プレートをさらに1時間インキュベート後、マイクロタイタープレートリーダーで蛍光を測定した。

【0133】

種々の作用を有する広範な化合物を薬局方から選択したにもかかわらず、全部ではないが咽頭ポンピング速度活性を有するほとんどの化合物がCNS薬、カルシウムチャネルインヒビター、および筋肉弛緩薬のファミリーに属し、これは、*C. elegans*咽頭アッセイは上記の領域で活性を有する化合物スクリーニングの良好なモデル系であることを示す。

【0134】

プロトコールの変形形態により、いくつかの新規の化合物（以前に検出したほとんどの化合物）が検出され、これらには、以下のが含まれる：メトリホナート、フィソスチグミン、アトロピン、レーヒヨスチアミン、ジフェニルヒダントイン、およびZAPA。これら全ての化合物は、CNS薬として公知であるか、アルツハイマー病の治療に使用されているか、抗精神病薬、抗鬱薬、または抗癲癇薬として使用されている。

【0135】

実施例4：化合物の作用様式の選択および特異的標的に作用する化合物の選択。14種の咽頭ニューロンのうち、少なくともニューロンI1、I2、M3、MC、NSM、M1、RIP、およびM4は咽頭ポンピングに重要であることが示されており、ニューロンMC、M3、M4、およびNSMは咽頭の収縮／ポンピング比を制御することが公知である。これらは、それぞれポンピング速度、筋肉弛緩のタイミング、峽部蠕動、および食物の認知を調節する。線虫*C. elegans*におけるニューロンシグナル伝達に関与する主な神経伝達物質は、アセチルコリン、セロトニン、グルタミン酸、オクトパミン、ドーパミン、およびGABAである（線虫*Caenorhabditis elegans*、W. B.

Wood et al. 編、CSHL press、1988、337～392）。

【0136】

基本的咽頭スクリーニングで選択された薬物（実施例3）から、咽頭ポンピング速度は神経伝達物質のインヒビターおよびアゴニストならびに神経伝達経路（カルシウムチャネル、ナトリウム／カルシウムチャネル、塩素イオンチャネル）を阻害するか向上させる化合物に影響を受けることが明らかである。これらの化学物質は、広範な処方薬（抗鬱薬、抗精神病薬、抗不安薬、精神安定剤、抗癲癇薬、筋肉弛緩薬、鎮静薬、抗片頭痛薬、鎮痛剤、または睡眠薬など）で使用されている。これらの中樞神経系（CNS）関連薬のいくつかは、CNS関連性遺伝病（パーキンソン病およびアルツハイマー病）などの疾患領域に適用されている。

【0137】

本発明のCNS関連薬を概説するために、神経伝達物質経路カスケードにおけるその生化学的機能にしたがって分類することが最適である。簡単に述べれば、CNS関連薬は、少なくとも以下の経路の特徴によって影響され得る。

- CNS薬は前駆体化合物に影響され得るか、神経伝達物質合成用の前駆体分子であり得る。
- CNS薬は、神経伝達物質合成を向上、阻害、または調整することができる。
- CNS薬は、伝達物質の枯渇機能を有し得る。
- CNS薬は、シナプス間隙中のシナプス小胞からの伝達物質の放出を防止するか刺激することができる。
- CNS薬は、レセプターのインヒビターまたは刺激剤として機能することができる。
- CNS薬は、伝達物質を模倣することができる。
- CNS薬は、誘導インヒビターまたはアクチベーターとして機能することができる。
- CNS薬は、誘導遮断のアクチベーターまたはインヒビターとして機能することができる。

—CNS薬は、ニューロン興奮後の伝達物質の再取り込みを防止または刺激する。

—CNS薬は、偽伝達物質（－／＋）として機能することができる。

【0138】

全て神経伝達物質経路に関連するこれらの特徴のほとんど（多数のCNS関連薬）を、塩化物イオンチャネル遮断薬、ナトリウム／カリウムチャネル遮断薬、カルシウム遮断薬、および他のイオンチャネル遮断薬のクラスで見出すことができる。

【0139】

CNS関連薬をスクリーニングするために、先行技術でいくつかの「*in vitro*」スクリーニング法が開発されている。これらのスクリーニング法（「*in vitro*結合アッセイ」または「クローン化輸送体アッセイ系」とよぶ）は、当業者に周知である。これらのアッセイでは、特定のレセプターを保有する細胞膜を、哺乳動物組織または特異的組織培養物から単離する。ほとんどの場合、所望のレセプターを過剰発現する細胞からこれらの膜を単離する。膜に存在するレセプター型に依存して、神経伝達物質（アセチルコリン、ドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、GSBA、およびオクトパミンなど）だけでなくホルモン物質（ノルエピネフリン、アドレナリンなど）などがスクリーニングアッセイの対象である。レセプターリガンド（ほとんどの場合神経伝達物質である）が放射性標識されている場合、レセプターへのリガンドの結合速度の測定が可能である。次いで、レセプターへの放射性リガンドの結合速度を比較する実験条件を設定することができる。次いで、レセプターへのリガンドの結合を変化させる推定CNS薬および他の化学物質を単離することができる。この方法のいくつかの変形形態が開発されており、そのいくつかにより、リガンドの再取り込みを阻害する化合物（セロトニン、ノルエピネフリン、およびドーパミンなど）を単離することができる（Koppel et al.、Chem. Biol.、1995、Jul 2：7、483～7；Beique et al.、Eur. J. Pharmacol.、1998、May 15、349：1、129～32）。CNS関連薬のスクリーニング用に開発されている他の系は、哺乳動物由来の

単離組織または器官を含む。さらに、マウスなどの生きた動物を用いたCNS関連薬を単離するための系が記載されている。

【0140】

これらのスクリーニングアッセイを使用して神経伝達物質のアンタゴニストを単離することができるにもかかわらず、これらの「*in vivo*」アッセイは、所望のレセプターとの会合のみを監視するので、単離化合物の*in vivo*効果を反映しない。さらに、神経伝達物質経路カスケードにおけるそれぞれの潜在的な標的について、「*in vitro*結合アッセイ」を開発する必要がある。さらに、上記のCNS関連薬の推定標的のいくつかについては、アッセイが開発されていないか、これらのアッセイは開発が困難であるか、高処理スクリーニングが不可能である。組織および動物モデルを用いた公知の全てのアッセイもまた、後者の問題を抱えている。さらに、動物組織または器官を使用したアッセイは、大量の動物の屠殺および高等動物の使用に基づく方法のスクリーニングを含み、動物福祉の問題により避けられつつある。

【0141】

咽頭ポンピングアッセイ法を使用して、神経伝達物質（アセチルコリン、ドーパミン、セロトニン、グルタミン酸、オクトパミン、GABAなど）が活性を示すかどうかを同定することができる。さらに、新規に単離した化学物質の作用様式を決定し、潜在的な薬理学的活性を有する化学物質の一定の経路を選択的にスクリーニングすることが可能である。

【0142】

1つまたは複数の遺伝子が欠損している*C. elegans*線虫変異体群が構築されている。標準的技術（すなわち、遺伝子ノックアウト）によって欠損を安定に移入することができるが、RNAi技術によって一過性に移入することもできる。両技術は*C. elegans*遺伝学の分野で周知である。この線虫群に影響を与える遺伝子は、1つまたは複数の神経伝達物質経路に関連するものである。影響を受ける遺伝子の例は、神経伝達物質レセプター（ムスカリンレセプター、グルタミン酸レセプター、ホルモンレセプターおよび5-HTレセプター、カンナビノイドレセプター、アドレナリンレセプター、ドーパミンレセプター、オ

ピオイドレセプター、GABAレセプター、アデノシンレセプター、VIPレセプター、およびニコチンレセプターなど）、神経伝達物質合成または神経伝達物質放出経路に関与するタンパク質、Gタンパク質結合レセプターをコードする遺伝子、アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、cAMP応答エレメント結合タンパク質、ホスホリパーゼCなどのGタンパク質結合二次メッセンジャーについてのタンパク質をコードする遺伝子、ギャップ結合機能をコードする遺伝子、ならびにイオンチャネルおよびイオンポンプをコードする遺伝子である。

【0143】

上記の実施例に記載のように咽頭ポンピングスクリーニングにおいてこれらの変異体を試験し、参考に結果を蓄積しておく。次いで、咽頭ポンピングスクリーニングにおいて未知の作用様式を有する化合物を試験し、得られた結果を変異体から得た参考結果と比較して、化合物の作用様式または経路を決定する。

【0144】

これらの変異体に加えて、トランスジェニック蠕虫も構築した。標準的な技術（*Method in Cell Biology*、第48巻に記載）を使用して、ヒト遺伝子を発現するように*C. elegans*を操作することができる。一過性および安定なトランスジェニック線虫を再度構築することができ、線虫*C. elegans*における非相同的および相同的導入遺伝子操作法は、当該分野で周知である。これらの導入遺伝子を、咽頭特異的プロモーターを使用して咽頭細胞中に単独で発現させることができるが、咽頭のポンピング速度に影響を与えるニューロン中に単独で発現させることもできる。

【0145】

CNS関連薬の領域で活性な化学物質をスクリーニングするか単離するために、トランスジェニック*C. elegans*中で発現する導入遺伝子は、神経伝達物質レセプター（ムスカリンレセプター、グルタミン酸レセプター、ホルモンレセプターおよび5-HTレセプターなど）、神経伝達物質合成、神経伝達物質放出経路、およびGタンパク質結合レセプターをコードすることができる。これらの導入遺伝子は、ヒト起源の配列をコードするタンパク質であり得る。現在までに、少なくとも400個のGタンパク質結合レセプターが配列決定されている。

さらに、アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、cAMP応答エレメント結合タンパク質、ホスホリパーゼCなどのGタンパク質結合二次メッセンジャーについてのタンパク質をコードする遺伝子、ギャップ結合機能をコードする遺伝子、ならびにイオンチャネルおよびイオンポンプをコードする遺伝子を、線虫の咽頭またはニューロンに発現させることができる。

【0146】

上記のトランスジェニック *C. elegans* は、野生型の遺伝的背景を有するか、変異 *C. elegans* 株であり得る。好ましくは、蠕虫は、ヒト化されており、これは、ヒト起源のタンパク質コード核酸配列である導入遺伝子が対応するタンパク質をコードする *C. elegans* 遺伝子用に作製した変異させた蠕虫で発現することを意味する。

【0147】

咽頭ポンピングアッセイでの使用に適切であり得る変異体の広範なリストを、*C. elegans* II、CSHL press および「*C. elegans* ゲノムの神経生物学」、C. I. Bargmann、*Science*、282、2028～2033に見出すことができる。Gタンパク質の完全なリストを、「*Caenorhabditis elegans* の完全なGタンパク質遺伝子ファミリー」、Jansen G. et al.、*Worm Breeders Gazette*、第15(5)巻、1999年2月に見出すことができる。

【0148】

ニューロンスIGNAL伝達経路の成分をコードする遺伝子中に変異を有する *C. elegans* 変異体のいくつかの例を、以下に列挙する。対応する *C. elegans* およびヒトタンパク質をコードする導入遺伝子の発現を *C. elegans* 野生型または *C. elegans* 変異株で操作して、トランスジェニックおよびヒト化蠕虫を得ることができる。

【0149】

【表1】

表1

神経伝達物質/経路	C. elegans 変異体
アセチルコリン	eat-18, eat-2, chat-1, unc-17
アセチルコリンエステラーゼ	ace-1, ace-2, ace-3
ニコチン酸アセチルコリン レセプター	unc-29, unc-38, lev-1, deg-3, acr-2
ドーパミン	cat-2, cat-4, bas-1, cat-1, cat-3, cat-5
セロトニン	bas-1, mod-5, goa-1
グルタミン酸	avr-15, eat-4, glr-1
GABA	unc-47, unc-25, unc-46, unc-49, exp-1
Na ⁺ /K ⁺ ATPアーゼサブ ユニット	eat-6
カルシウムチャネル	eat-12, unc-2, unc-36, unc-13
その他	eat-5, unc-7, unc-18, rab-3, snt-1, ric-4, snb-1, unc-64, unc-50, unc-74

【0150】

C. elegans Genetic Center, University of Minnesota, St. Paul, MinnesotaのC. elegans変異体群から、C. elegans C. elegans変異体の範囲を得ることができる。あるいは、特異的変異体を標準的方法で作製することができる。このような方法は、Anderson, Methods in Cell Biology、第48巻、「C. elegans: 生物の現代生物学的分析」、31~58に記載されている。所望の遺伝子が欠失したへに蠕虫を選択するために、PCR技術のいくつかの選択ラウンドを行うことができる。標的化欠損遺伝子発現を使用した変異体の他の作製法は、Sutton and Hodgkin, Zwaal et al. およびFire et al. (上記)に

記載されている。

【0151】

実施例5：用量反応。咽頭ポンピングアッセイの感受性を同定するために、いくつかの化学物質について連続希釈を行った。化合物には、クロミプラミン、タモキシフェン、BP554、ピマジド、およびタブシガルジンが含まれる。濃度範囲を1 μ M未満～100 μ Mまでとし、ポンピングアッセイを上記の実施例に記載のように繰り返した。これらの結果から、明白な用量反応曲線を作製することができる。

【0152】

この実験により、咽頭ポンピングアッセイは定量的であり、これを使用して化学物質のIC50およびED50を同定することができることが明白に示される。

【0153】

さらに、この実験から、化学物質の毒作用を検出することができる。エンハンサークロミプラミンの用量反応曲線は、高濃度の溶媒DMSOの毒作用が明白に示される(図5)。

【0154】

最後に、二次標的に対する化学物質の効果の検出または種々の濃度の化学物質の副作用の検出が可能である。これにより、SERCAのインヒビターとして公知のタブシガルジンの用量反応曲線が*C. elegans*咽頭のポンピング速度を減少させることが認められる(図6)。にもかかわらず、低濃度でのポンピングの向上が認められる。これは、タブシガルジンのこの特徴の第一の所見である。さらに未知のタブシガルジンの二次標的または他の副作用によって引き起こされるこの挙動を説明するためにさらなる研究が必要であり、この実験により、咽頭アッセイの感度および用量反応曲線を編集するための咽頭アッセイの使用が明白に示される。

【0155】

実施例6：遺伝学技術を使用した化学物質活性の検出。*C. elegans*咽頭のポンピング速度を測定するための他の技術が存在する。咽頭は筋肉であるの

で、咽頭の収縮性は内部カルシウムレベルに依存する。これらのカルシウムレベルを、特異的カルシウム感受性レポーター遺伝子を使用して測定することができる。

【0156】

*C. elegans*の咽頭におけるカルシウムレベルの測定によって電気的活性の増加を直接検出することができることがKerr et al. (West coast Worm meeting abstract, 77, 1998) によって報告されている。それに記載のカルシウム感受性レポータータンパク質は、エクオリンおよびGFP-カルモジュリンである(Miyawaki et al., Nature, 388, 882~887)。

【0157】

この研究では、*C. elegans*の咽頭中でGFP-カルモジュリンが発現され、二光子顕微鏡を用いて蛍光が認められた。インベルメクチンなどのポンピングインヒビターおよびセロトニンなどのポンピングエンハンサーが予想される方法で観察されたGFP-カルモジュリンの蛍光に影響を与えることが示されている。

【0158】

GFP-カルモジュリンを発現する類似のトランスジェニック蠕虫を使用した、咽頭ポンピングアッセイ法を使用して線虫の咽頭のポンピング速度に影響を与える化学物質をスクリーニングすることができる。前述の実施例におけるカルセイン-AMについて記載のポンピングアッセイと同様に、トランスジェニック蠕虫をマルチウェルプレートに置き、化学物質を添加する。次いで、同一のマルチウェルプレートリーダー装置を用いて、カルセイン蛍光よりもむしろGFP-カルモジュリンの蛍光を測定する。

【0159】

適切なプロモーター配列を使用して、他の筋肉組織またはニューロンにおけるエクオリンまたはGFP-カルモジュリンの発現を操作してこれらの細胞中のカルシウムレベルを監視することができる。このようなトランスジェニックを、上記のスクリーニングで使用する事ができる。

【0160】

実施例7：遺伝子エンハンサーおよびサプレッサーのスクリーニング。所与の化合物の活性を向上、抑制、または調整する遺伝子および生化学的経路を見出すことができる。化合物を線虫 *C. elegans* に適用した場合、表現型の変化が認められるが、しかし、化合物の標的またはその作用様式は既知であるか未知であり得る。下記のスクリーニング法を使用して、*C. elegans* の表現型に対する定義された効果を有する化合物の活性を抑制するか向上させる遺伝子を同定することができる。

【0161】

化合物2, 5-ジフェニルオキサゾールは、野生型蠕虫および構成的にポンピングする蠕虫の両方の咽頭のポンピング速度のインヒビターである。*C. elegans* に対して定義された効果を有する化合物の例として、本明細書中ではこの化合物を使用する。

【0162】

C. elegans 蠕虫を、標準的技術 (EMS、TMP-UV、または照射など) を使用したランダム変異誘発に供する (Methods in Cell Biology、第48巻)。これらの変異誘発蠕虫のF1世代を、蠕虫ごとにマルチウェルプレートのウェルに置き、蠕虫を成長させて子孫を産生させる。子孫が所望の成長期に達した場合、2, 5-ジフェニルオキサゾールおよびカルセイン-AMを添加する。プレートを約1時間さらにインキュベートし、発生したカルセインの蛍光を、マルチウェルプレートリーダーを使用して測定した。より高い蛍光読み取りを有するウェルを記録した。これらのウェル中の蠕虫は、遺伝子中に変異を保有するか2, 5-ジフェニルオキサゾール活性を抑制するので、さらなる分析に使用した。

【0163】

咽頭ポンピングのエンハンサーである化合物ドクサピンを使用して、類似のスクリーニングを行った。化合物ドクサピンの存在下でポンピング表現型の減少を示す変異体を記録した。

【0164】

実施例8：化合物（タブシガルジン）のアンタゴニストのスクリーニング。化合物タブシガルジンは、Sarco／小胞体カルシウムATPアーゼ（SERCA）の活性を阻害することが公知である。SERCAタンパク質は、カルシウムをsarco／小胞体にポンピングし、カルシウムが内部に保存された細胞が得られる。カルシウムの内部保存は、筋肉活性に重要である。C. elegansでは、タブシガルジンの蠕虫への適用によるSERCA活性の阻害により、咽頭ポンピング速度が減少する。線虫C. elegansに対するタブシガルジン作用によって認められる他の特徴は運動性の低下であり、これは体壁筋のSERCA活性の阻害の結果である。

【0165】

SERCAに対するタブシガルジンの活性を抑制する化学物質をスクリーニングするための咽頭ポンピングスクリーニングを開発した。上記のように、C. elegans線虫（野生型線虫および構成的ポンピング咽頭を有する線虫の両方）を、マルチウェルプレートのウェルに置く。上記のように、阻害濃度のタブシガルジンを蠕虫に添加し、5～10 μ Mの濃度のカルセイン-AMを添加する。最後に、選択した化学物質を添加する。第2の化学物質を含まないタブシガルジンを含むコントロールウェルも準備する。

【0166】

咽頭ポンピングスクリーニングと同様に、マルチウェルプレートリーダーを使用して蛍光を測定する。測定した蛍光が化学物質を含まないコントロールウェルよりも高い化学物質を保有するウェルを記録する。これらのウェルは、タブシガルジンの阻害活性が抑制されるのでタブシガルジン活性のアンタゴニストである化学物質を保有する。したがって、同定された化学物質は、タブシガルジンの活性を直接阻害するか、SERCA活性を刺激するか、SERCA経路（すなわち、生物のカルシウム生物学）に対してエンハンサー活性を有し得る。

【0167】

このスクリーニングで選択された化学物質を、潜在的な治療薬、または生物のカルシウム生物学の機能障害の原因である疾患領域の治療薬のさらなる開発の出発物質と考えられる。これらの治療薬が有用な疾患領域の例は、心肥大、心不全

、高血圧、H型糖尿病、プロディー病である。

【0168】

上記の例では、*C. elegans*に対する定義された表現型効果を有する化合物の例としてタブシガルジンを使用した。咽頭ポンピング速度に対して阻害活性を有する任意の化合物を類似のスクリーニングで使用する事ができる。

【0169】

咽頭ポンピング速度を向上させることが公知の化合物に対してアンタゴニスト活性を有する化学物質を選択するためのスクリーニングを行うこともできる。このような実験では、咽頭ポンピングを向上させることが公知の化合物の存在下で咽頭ポンピング速度を減少させる場合、化学物質を記録する。

【0170】

他のカルシウムポンプおよび他のイオンポンプを阻害する化合物を使用して、類似の実験を行うことができる。

【0171】

実施例9：トランスジェニック変異体およびヒト化動物中の化学物質（SERCA-PLB）のスクリーニング。ヒトSERCA-2タンパク質は、ホスホランバン（PLB）として公知の少なくとも1つのタンパク質によって負に制御されることが公知である。両タンパク質は、脊椎動物の心臓で発現され、この相互作用の特徴について文献に広範なリストが存在する。

【0172】

カルシウムの内部保存の増加は、一般に、筋収縮強度に受容であると考えられ、したがって、この筋収縮の改良または増加をSERCA活性の向上によって実現することができる。SERCA活性を向上させるかSERCA-PLB相互作用を阻害する化学物質は、潜在的な治療薬または細胞または生物のカルシウム生物学の機能障害の原因である疾患領域の治療薬のさらなる開発の出発物質と考えられる。SERCA活性が有利であり得る疾患領域の例は、心肥大、心不全、高血圧、11型糖尿病、プロディー病である。

【0173】

異なる疾患型に関連するいくつかのSERCA遺伝子およびイソ型が存在し、

SERCA 2 および PLB は心血管疾患に関連し、SERCA 1 およびサルコリピンは骨格筋疾患に関連し、3つのSERCA遺伝子は非インスリン依存性真性糖尿病に関連する。

【0174】

SERCA経路の活性を調整する化学物質を同定するためのスクリーニングを行うために、SERCA遺伝子およびPLBを*C. elegans*中で発現させた。これらの遺伝子発現を、以下の活性を有するいくつかの特異的プロモーターの調節化で制御することができる。

- a) 咽頭中の発現を促進する*C. elegans* myo-2プロモーター、
- b) *C. elegans* 筋肉（咽頭、陰門筋、および体壁筋を含む）中の発現を促進する*C. elegans* SERCAプロモーター。

【0175】

以下のトランスジェニックを構築した。

- a) SERCA および／または myo-2 プロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCA。
- b) *C. elegans* SERCAを変異させた*C. elegans*（ノックアウトおよび選択変異）におけるSERCAおよび／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCA。
- c) SERCA および／または myo-2 プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB。
- d) *C. elegans* SERCAを変異させた*C. elegans*（ノックアウトおよび選択変異）におけるSERCAおよび／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB。
- e) SERCA および／または myo-2 プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB-GFP。
- f) *C. elegans* SERCAを変異させた*C. elegans*（ノックアウトおよび選択変異）におけるSERCAおよび／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCA。
- c) SERCA および／または myo-2 プロモーター下でのブタおよび／また

はヒトPLB-GFP。

g) SERCAプロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCAならびに／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB。

h) *C. elegans* SERCAを変異させた*C. elegans* (ノックアウトおよび選択変異) におけるSERCAプロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCAならびに／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB。

i) SERCAプロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCAならびに／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB-GFP。

j) *C. elegans* SERCAを変異させた*C. elegans* (ノックアウトおよび選択変異) におけるSERCAプロモーター下でのブタおよび／またはヒトSERCAならびに／またはmyo-2プロモーター下でのブタおよび／またはヒトPLB-GFP。

【0176】

構築したこれらのトランスジェニックおよび変異動物のいくつかは、カルセイン-AM咽頭ポンピングアッセイを使用して腸中のカルセイン蛍光によって測定することができるので、明白な咽頭ポンピング速度の変化を示す。これらの株のいくつかは、さらなるスクリーニング開発に有用であると考えられた。前述の実施例に記載のように、トランスジェニックおよび変異動物をマルチウェルプレートに置いた。次いで、カルセイン-AMおよび試験化学物質を添加した。腸で形成されたカルセインの蛍光を、蛍光を測定するように設定したマルチウェルプレートリーダーで測定した。咽頭ポンピング速度の特性を変化するのでSERCA経路の機能および活性を変化させる化学物質をさらなる分析用を選択し、これは、治療用の潜在的な化合物またはさらなる治療薬開発の出発物質と考えることができる。

【0177】

SERCA1遺伝子およびそのレギュレーターを使用してその活性および／または制御を変化させる化学物質を検出するための類似の実験を行うことができる。

【0178】

実施例10：トランスジェニックおよび／または変異動物における化学物質（神経変性）のスクリーニング。線虫の咽頭の解剖学は、いくつかの部分からなり、いくつかの細胞および細胞型が含まれる。これらには、咽頭筋、咽頭上皮細胞、咽頭腺、および咽頭ニューロンが含まれる。少なくとも14種のニューロンがニューロン機能に関連し、そのうち最も重要なものはI1、I2、I3、M3、MC、NSM、M1、RIP、およびM4である（「線虫*Caenorhabditis elegans*」、W. B. Wood et al. 編、1988、CSHL pressに概説）。

【0179】

咽頭の任意の部分（咽頭筋、咽頭上皮細胞、咽頭腺、咽頭ニューロン）の変異または機能不全により、咽頭ポンピング速度が変化する。ポンピング速度が変化を生じるか、ポンピング形態学の変化を有するいくつかの変異が文献中で公知である。

【0180】

咽頭機能、咽頭ポンピング、および咽頭形態学に関連する細胞を変化させる別の方法は、線虫にトランスジェニック技術を適用することである。咽頭解剖学および咽頭機能に関連する1つの細胞中の毒性遺伝子の発現により、それぞれの細胞が変性されるか、機能不全になるか、または異常に発達する。結果として咽頭のポンピング速度が変化する、おそらくポンピング速度が減少する。

【0181】

この目的で使用するすることができる毒性遺伝子の例を上列記する。組織特異的方法においてこれらの遺伝子を発現するトランスジェニック*C. elegans*を構築することができる。例えば、myo-2プロモーターは咽頭筋中の発現を誘導し、unc-129プロモーターはニューロン細胞中の発現を誘導する。各細胞型または組織について、組織の変性を正確に調節することができるように細胞型特異的組織特異的プロモーターを選択することができる。毒性遺伝子の発現が1つの特異的細胞のみで誘導されるような方法で、プロモーターを選択する

ことができる。

【0182】

咽頭解剖学または咽頭ポンピングを変化させる変異体およびトランスジェニックを、遺伝子または形態学的欠失を修復または回復する化学物質を選択するための咽頭ポンピングスクリーニングで使用する事ができる。変異体またはトランスジェニック動物のポンピング速度が減少している場合、スクリーニングによりポンピング速度を向上させる化学物質を同定することが好ましい。変異体またはトランスジェニック動物のポンピング速度が増加している場合、スクリーニングによりポンピング速度を減少させる化学物質を同定することが好ましい。

【0183】

【表2】

表 2

遺伝子	対立遺伝子	咽頭表現型	他の表現型
dig-1	n1321	ねじれ	
eat-6	ad467	弛緩欠損	ATPアーゼ
eat-13	ad522	弛緩欠損	成長の遅延
goa-1	sy192	ポンピングの増加	異常に活発
mig-4	rh51	ねじれ	
mlc-2		ポンピングの欠損	幼虫の死滅
pha-2	ad427	咽頭奇形	幼虫の死滅
pha-3	ad607	咽頭奇形	成長の遅延
phm-2	ad538	弛緩欠損	
cha-1	p1152	ポンピングの遅延	非協調的運動
clk-1	e-2519	ポンピングの遅延	遅い
eat-1	ad427	不規則なポンピング	細長い
eat-2	ad451	ポンピングの遅延	コリンアゴニストに 対して異常に敏感
eat-3		非常に遅いポンピング	誤形成
eat-4		ポンピング欠損	
eat-5		非同調的ポンピング	
eat-7		睡眠	
eat-8		短いポンピング	
eat-9		異常なポンピング	わずかに飢餓
eat-14		弛緩欠損	運動欠損

【0184】

【表3】

表 2 の つづき

遺伝子	対立遺伝子	咽頭表現型	他の表現型
eat-18		遅いポンピング	飢餓
eat-x		ポンピング欠損	
osm		遅いポンピング	走化性欠損
snt-1		ポンピング欠損	非協調的運動
unc-11		遅いポンピング	ねじれ
unc-13		異常なポンピング	麻酔状態
unc-17		遅くて異常なポンピング	小さい
unc-26		遅いポンピング	ほとんど運動しない
unc-31		構成的ポンピング	遅い
unc-36		異常なポンピング	麻酔状態
unc-57		遅いポンピング	小さい
unc-58		粘着性ポンピング	震え
unc-90		粘着性ポンピング	短い
unc-105		粘着性ポンピング	成長が不十分
sma-1		咽頭欠損	
sma-2		ポンピングの減少	
sma-3		咽頭欠損	
sma-4		咽頭欠損	
exp-2	sa26/+	速くて浅いポンピング	少し運動し、産卵欠損、便秘

【0185】

実施例 12 : 耐性幼虫を用いたアッセイ、神経変性、および d a f - 7 プロモーターの使用の特例。C. e l e g a n s の A S I ニューロンは、化学感覚神経であり、食物認識および咽頭ポンピングに必須である。A S I または A D F または A S G または A S J ニューロンの破壊による耐性幼虫が形成されることが以前

に報告されている。レーザー切断を用いて1つまたは複数のこれらのニューロンを死滅させたこれらの実験を行った。(Schackwitz WS et al., Neuron, 17, 719~728, 1996)。さらに、Daf-7 (TGF- β ファミリーメンバー) がASIニューロン中で特異的に発現されることが報告されている。

【0186】

実施例11と類似の実験では、ASIニューロンを死滅させるか、破壊するか、その性質を変化させる。より詳細には、daf-7プロモーターの調節化での毒性遺伝子の発現の誘導によって、毒性遺伝子をこのニューロン中に発現させる。このような方法におけるASIニューロンの破壊によって、耐性幼虫が形成される。

【0187】

このような株を上記のスクリーニングに使用する。第1の実施例では、得られた耐性幼虫を、咽頭ポンピングアッセイに使用した。耐性蠕虫は、咽頭ポンピングを行わないか、減少した咽頭ポンピングのみを行う。蠕虫が耐性表現型を迂回して咽頭ポンピングを回復する化学物質を同定した。前述のように、咽頭ポンピング速度を、カルセイン-AMを使用して測定した。

【0188】

第2の実施例では、耐性幼虫を運動性アッセイに供した。耐性幼虫は運動せずに壁に沈殿するので、これを運動性アッセイに使用して蠕虫が耐性表現型を迂回して蠕虫の運動性を変化させる化学物質を同定することができる。ウェルの中央より上の自己蛍光を使用して、蠕虫の運動性挙動を検出した。

【0189】

実施例13：耐性幼虫を使用したアッセイの特例。Daf-2 tsは、通常15℃で成長するが、25℃では100%が耐性幼虫を形成する線虫変異体であり、これらの変異体をスクリーニングに使用して蠕虫が耐性表現型を迂回する化学物質を単離することができる。

【0190】

このようなアッセイを行うために、同期化L1 Daf-2 ts蠕虫をマイ

クロタイタープレーのウェル上に分配する。同期化卵も使用することができる。蠕虫に食物を供給し、25℃でさらに成長させて耐性幼虫を形成させた。約4日後、試験化合物およびカルセイン-AMを添加し、25℃に温度を維持しながら1時間～4日間の範囲の選択した時間間隔で蛍光を測定する。蠕虫が耐性表現型を迂回する化合物を記録した。食物基質の存在により、マルチウェルプレートリーダーを使用して蛍光を検出するのは困難である。この場合、代わりにFANデバイスを使用して蛍光を測定することができる。

【0191】

L1蠕虫と共に試験化合物をウェルに添加する類似の実験を行うことができる。

【0192】

この実験の他の変形形態では、大量のDaf-2^{ts}耐性幼虫を培養した。次いで、耐性幼虫をマルチウェルプレートのウェル上に分配し、化学物質を添加した。マルチウェルプレートを、運動性アッセイを行うように設定した（すなわち、自己蛍光を測定する）マルチウェルプレートリーダー上に置いた。ウェルを25℃に維持しながら1時間～4日間の範囲の選択した時間間隔で自己蛍光測定値を記録した。

【0193】

実施例14：運動性アッセイを用いた化学物質および化合物アンタゴニストのスクリーニング。線虫変異体（ace-1；ace-2）は、全く運動性を示さず、痙攣様表現型を有する。蠕虫は全く洞様形を示さないが、直線状である。これらは、変異体がアセチルコリンエステラーゼで変異されてシナプス中のアセチルコリン濃度が高いからである。ネオスチグミン（周知のアセチルコリンエステラーゼインヒビター）を、マルチウェルプレートのウェル上に分配した野生型蠕虫に添加して、約2時間後に運動性アッセイに供した。図8のパネル1は、ネオスチグミンに暴露した蠕虫の運動性が明らかに減少することを示す。

【0194】

ヘキサメトニウムおよびメカミラミンは周知のアセチルコリンレセプターアンタゴニストであるので、ace1；ace2変異体のシナプスへのアセチルコリ

ンの過剰充填を抑制して運動性を修復または回復する。レセプターアンタゴニストとして、ヘキサメトニウムはまた適切なシグナル伝達を妨害するので運動性が減少する。図8の最後のパネルでは、ヘキサメトニウムは野生型蠕虫の運動性を抑制するが、ネオスチグミンより有意に少ないことが明白に示される（100%は野生型蠕虫の正常な運動性を示す）。

【0195】

別の実験では、運動性を妨害するために、野生型蠕虫を阻害濃度のネオスチグミンと接触させた。少しのインキュベーション後、種々の濃度のヘキサメトニウムを添加し、ウェルを運動性アッセイ（自己蛍光の測定）に供した。図8に示すように、漸増濃度のヘキサメトニウムによって予想したように運動性が増すが（ヘキサメトニウムはアンタゴニストである）、非常に高濃度（しかし最後のパネルに示した濃度より低い）のヘキサメトニウムでは毒作用が認められ、運動性が減少する。この毒作用は、おそらく高濃度のネオスチグミンおよびヘキサメトニウムの存在による。

【0196】

ace-1; ace-2二重変異体を使用して類似の実験を行った。この実験では、ネオスチグミンの非存在下で漸増濃度のヘキサメトニウムをウェルに添加した。両実験結果を比較した。

【0197】

この実験は、化学物質を選択するための運動性アッセイの能力および選択された化合物のアンタゴニストを明白に示す。

【0198】

実施例15：雌雄同体（非自殖）を使用した交配アッセイの例。交配実験による子孫の計数によって、線虫の交配挙動の高処理分析を行うことができる。第1に、マルチウェルプレートのウェル上に等量の雄蠕虫を分配した。次いで、各ウェルが等量の雌雄同体を含むような方法で雌雄同体をウェル上に添加した。雄と雌雄同体との比は、実験によって変化し得る。

【0199】

この実験で選択した雌雄同体は自己子孫が減少するか、子孫は生存不可能であ

り、好ましくは雌雄同体は自家不稔性を示す（*fer*または*spe*における雌雄同体変異体など）。さらに、交配を向上させるために、自家不稔性雌雄同体は運動性が減少しているか運動表現型を示さないことが好ましい。この実験における雄は野生型雄、変異雄、トランスジェニック雄、またはヒト化雄であり得る。

【0200】

上記のように全子孫産生数の測定によって、交配挙動を評価する。

【0201】

実施例16：雌雄同体（非自殖）発現GFPの交配アッセイの例。また、運動性減少表現型を有し且つGFPを安定に発現する特異的自家不稔性トランスジェニック雌雄同体を用いて、交配アッセイを行った。この交配アッセイの全子孫はGFPを発現するので、マルチウェルプレートリーダーまたはFANSを使用したGFP蛍光の測定によって子孫数を容易に検出することができる。発光マーカ一などの他のマーカ一を発現する雌雄同体を、類似の実験に使用することができる。

【0202】

実施例17：GFPを発現する雄の交配アッセイの例。交配アッセイの別の変形形態では、雌雄同体を以下の組み合わせで選択した。

- a) 雌雄同体は、野生型雌雄同体、減少した運動表現型を示す雌雄同体であった。
- b) 雄線虫は、GFPを発現する野生型、トランスジェニック、変異、またはヒト化線虫であった。

【0203】

この実験では、交配に起因する子孫のみがGFP発現を示すので、雌雄同体の自家不稔性の子孫および真の交配に起因する子孫を、GFPの蛍光に従って分配することができる。

【0204】

実施例18：雄特異的ニューロン。以下の表3は、*C. elegans*の雄特異的ニューロンおよびその交配挙動の役割を列挙する。例えば毒性遺伝子の発現による1つまたは複数のこれらのニューロンの破壊により、交配スクリーニング

に有用であり得る *C. elegans* 変異体を得ることができる。

【0205】

【表4】

表3

ニューロン	構造	クラス	役割
CAn	腹側の索	運動	?
CPn	腹側の索	運動	回転
CEMn	ヘッド	感覚	?
DXn		運動	?
DVE		介在	?精子活性化または輸送
DVF		介在	?精子活性化または輸送
EFn			回転
HOA	ホック	感覚	陰門の位置
HOB	ホック	感覚	陰門の位置
PCA	p. c. s.	感覚	陰門の位置
PCB	p. c. s.	感覚	陰門の位置
PCC	p. c. s.	感覚	陰門の位置
PGA	p. a. g.	介在	?
PGA	p. a. g.	介在	?
PVV	p. a. g.	介在	?
PVY	p. a. g.	介在	バックリング
R1A	放射線	感覚	背部反応?
R1B	放射線	感覚	背部反応?
R2A	放射線	感覚	腹側反応?
R2B	放射線	感覚	腹側反応?

【0206】

【表5】

表3のつづき

ニューロン	構造	クラス	役割
R3A	放射線	感覚	?
R3B	放射線	感覚	?
R4A	放射線	感覚	腹側反応?
R4B	放射線	感覚	腹側反応?
R5A	放射線	感覚	背部反応? 回転?
R5B	放射線	感覚	背部反応?
R6A	放射線	感覚	?
R6B	放射線	感覚	?
R7A	放射線	感覚	背部反応?
R7B	放射線	感覚	背部反応? 回転?
R8A	放射線	感覚	腹側反応? 回転?
R8B	放射線	感覚	腹側反応? 回転?
R9A	放射線	感覚	回転?
R9B	放射線	感覚	回転?
SPC	スピクラ	運動 / 自 発	スピクラ挿入
SPD	スピクラ	感覚	スピクラ挿入
SPV	スピクラ	感覚	射精の阻害

【0207】

実施例19: さらなる変異およびトランスジェニック *C. elegans*。以下の表4は、交配アッセイに使用することができる雄が交配挙動の異常を示す *C. elegans* 変異体を列挙する。

【0208】

【表6】

表4

遺伝子 (変異体)	欠損
cat-1, cat-2, cat-4, cod-5	回転
che-2, che-3, che-4, cod-10	接触反応
cod-1, cod-2, cod-4, cod-6, cod-7, cod-8	スピクラ挿入
cod-12, cod-13, cod-14, cod-15	陰門の位置
ram-1, ram-2, ram-3, ram-4, ram-5	放射線形態学

【0209】

以下の表5は、産卵アッセイに使用することができる変異C. *elegans* kを列挙する。

【0210】

【表7】

表5

遺伝子 (変異体)	欠損
egl-1, egl-43	H S Nは移動および分化に機能する
egl-1, sem-1, sem-4	陰門筋発達
egl-15, egl-17	性筋芽細胞移動
egl-10, egl-30	シナプス伝達

【0211】

特異的組織または細胞型における毒性遺伝子の発現の結果として産卵挙動の変化を示すトランスジェニックC. *elegans*を使用して、産卵アッセイを行うこともできる。適切な組織または細胞型特異的プロモーターの調節下で上記の毒性遺伝子の1つを使用した当該分野で公知の標準的技術にしたがって、適切な

トランスジェニック *C. elegans* を構築することができる。この目的に有用であり得るプロモーターには、*lin-31*、*egl-17*、*unc-17*、および *unc-53* プロモーターが含まれる。

【0212】

以下の表6は、排泄アッセイに使用することができる変異 *C. elegans* を列挙する。

【0213】

【表8】

表6

遺伝子 (変異体)	欠損
<i>aex-1</i> ; <i>aex-2</i> , <i>aex-3</i> , <i>aex-4</i> ; <i>aex-5</i> , <i>aex-6</i>	<i>aBoc</i> および排出
<i>unc-25</i> ; <i>unc-47</i> ; <i>exp-1</i> ; <i>exp-2</i>	便秘 (排出)
<i>pho-1</i> ~ <i>pho-7</i> , <i>egl-8</i>	<i>aBoc</i> 特異的
<i>dec-1</i> , <i>dec-2</i> , <i>dec-4</i> , <i>dec-7</i> , <i>dec-11</i> , <i>dec-12</i>	排泄周期

【0214】

特異的組織または細胞型における毒性遺伝子の発現の結果として排泄挙動の変化を示すトランスジェニック *C. elegans* を使用して、排泄アッセイを行うこともできる。適切な組織または細胞型特異的プロモーターの調節下で上記の毒性遺伝子の1つを使用した当該分野で公知の標準的技術にしたがって、適切なトランスジェニック *C. elegans* を構築することができる。この目的に有用であり得るプロモーターには、*unc-43* および *unc-25* プロモーターが含まれる。

【0215】

以下の表7は、運動性アッセイに使用することができる変異 *C. elegans* を列挙する。

【0216】

【表9】

表7

遺伝子 (変異体)	欠損
unc-17	アセチルコリンレセプター
ace-1; ace-2	アセチルコリンエステラーゼ ; 異常な頭部の運動
unc-25; unc-47	GABA ; 収縮
unc-15; unc-54	パラミオシン、ミオシン ; 麻痺状態
unc-86	Caチャンネル ; 麻痺状態

【0217】

【表10】

表 8

薬局方から単離した *C. elegans* 咽頭ポンピング速度の

エンハンサー

化合物名	作用様式	疾患領域	1時間のインキュベーション後陽性
クロミブラミン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
アミトリプチリン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
デシプラミン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
フルボキサミン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
ノルトリプチリン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
イミプラミン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
フルオキセチン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	+

【0218】

【表11】

表 8 のつづき

化合物名	作用様式	疾患領域	1 時間のインキュベーション後陽性
ドクサピン	未知	抗鬱薬、鎮痒薬	+
ノルドキセピン	未知	抗鬱薬、鎮痒薬	+
ミアンセリン	5HTアンタゴ ニスト		+
ノルクロミプラ ミン	ser 取り込み インヒビター	抗鬱薬	
シプロヘプタ ジン	ser レセプター アンタゴニスト	抗ヒスタミン薬、 鎮痒薬、食欲増進 薬	
シクロベンザブ リン	*	精神運動抑制剤、 筋肉弛緩剤	

【0219】

【表12】

表9

薬局方から単離した*C. elegans*咽頭ポンピング速度の

インヒビター

化合物名	作用様式	疾患領域	1時間のインキュベーション後陽性
ピモジド	D2アンタゴニスト	抗精神病薬	
ハロペリドール	D2アンタゴニスト	アルツハイマー、抗精神病薬	
トラザドン	セロトニン取り込み遮断、代謝産物 D2アンタゴニスト、5HT1アゴニスト	アルツハイマー、抗鬱薬、抗精神病薬	
BP554	5HT1アゴニスト		
イベルメクチン	塩素イオンチャネル遮断薬	駆虫薬	
レバミゾール		駆虫薬	
メトリホナート	コリンエステラーゼインヒビター	駆虫薬、アルツハイマー	+
フィソスチグミン	コリンエステラーゼインヒビター	アルツハイマー	+

【0220】

【表13】

表9のつづき

化合物名	作用様式	疾患領域	1時間のインキュベーション後陽性
タモキシフェン	塩素イオンチャネル遮断薬	抗ヒスタミン薬	
フルナリジン	Na/Caチャネル遮断薬	抗精神病薬	
タプシガルジン	カルシウムチャネル遮断薬		
α NETA	コリンアセチルトランスフェラーゼインヒビター		
アトロピン	コリン作用性アンタゴニスト		+
Ｌ-ヒヨスチアミン	コリン作用性アンタゴニスト	アトロピンの活性形態	+
ジフェニルヒダントイン		抗痙攣薬	+
ZAPA	GABAアンタゴニスト		+
2, 5-ジフェニルオキサゾール			

【0221】

【表14】

表10

C. elegansでの運動性アッセイを使用した、薬局方ライブラリー由来の80
0種の化合物をスクリーニングして得られた出発物質の部分的リスト

塩酸ハルマン	9	B4	1843115	555251	6085,208	1773,442	-
TPMPA	8	H6	21792	120778	71,94823	385,7584	出 発 物質
プラゾシン	4	E9	94689	113608	312,6242	362,8578	出 発 物質
ビガバトリン	6	H7	20828	61410	68,7655	196,1402	出 発 物質
(2S, 3R)- クロロフェグ	6	H8	21514	48736	71,03039	155,6601	出 発 物質
MSOPPE	6	E7	23760	44614	78,44576	142,4947	出 発 物質
(n)-アセチル カルニチン	2	C1 0	23457	44156	77,44537	141,0319	出 発 物質
DPPE	5	G1 1	20365	43629	67,23686	139,3487	出 発 物質
インドール- 2-カルボン 酸	2	A4	19362	43403	63,92537	138,6268	出 発 物質

【0222】

【表15】

表10のつづき

N-デシソブ ロビルプロパ ノールオール	6	A7	23737	43102	78,36982	137,6654	出 発 物質
YS-035	3	E3	21415	42457	70,70353	135,6054	出 発 物質
L-AP5	1	G2	21446	42393	70,80588	135,4009	出 発 物質
2,4-ジヒド ロキシフェニ ルアセチル- L-アスパラ ギン	2	G4	18057	42203	59,61679	134,7941	出 発 物質
L-AP3	2	G2	22073	41858	72,87597	133,6922	出 発 物質
D-AP5	1	F2	19717	41697	65,09743	133,178	出 発 物質
O-ホスホ- L-セリン	1	A3	20292	41086	66,99584	131,2265	出 発 物質
クロフィブリ ン酸	6	D9	22933	40916	75,71534	130,6835	出 発 物質
シス-アゼチ ジン-2,4- ジカルボン酸	7	D8	19503	40568	64,39089	129,572	出 発 物質

【0223】

【表16】

表10のつづき

L-AP4	1	C2	19824	39523	65,4507	126,2343	出 発 物質
スパグルミン 酸	3	E6	20295	38417	67,00575	122,7018	出 発 物質
アレカイジン ブター2-イ ニル-エステ ル	2	F5	20002	37675	66,03838	120,3319	出 発 物質
シクロロイシ ン	2	E4	19234	36560	63,50276	116,7707	出 発 物質
S(-)-アテ ノールオール	3	G6	18176	36336	60,00968	116,0552	出 発 物質
プロパノール オールグリコ ール	6	D7	17134	34849	56,56943	111,3058	出 発 物質
GF 109 203X	5	E11	15685	34448	51,78542	110,025	出 発 物質
ケトコナゾー ル	8	G1 1	15803	33531	52,17501	107,0962	出 発 物質

【0224】

【表17】

表10のつづき

DL-2-ア ミノスベリン 酸	1	H2	17141	33518	56,59254	107,0547	出 発 物質
HU 210	7	B9	15481	33514	51,1119	107,0419	出 発 物質
GR 466 11	7	F8	15815	33199	52,21463	106,0358	出 発 物質
7- (ジメチル カルバモイル オキシ) -6- フェニルピロ ロ	6	C2	14278	32900	47,14009	105,0808	出 発 物質
GBLD 3 45	6	G3	12620	32858	41,66605	104,9467	出 発 物質
L-701, 3 24	7	E6	14647	32476	48,35837	103,7266	出 発 物質
tADA	7	E8	16096	32342	53,14238	103,2986	出 発 物質
RS 170 53	8	B1 0	14439	32050	47,67164	102,366	出 発 物質
N-ベンジル ナルトリイン ドール	6	G6	14932	31760	49,29933	101,4397	出 発 物質

【0225】

【表18】

表 1 1

咽頭ポンピングアッセイを使用したT o r i s化合物ライブラリーのスクリーニング
から見出したC. e l e g a n s咽頭ポンピングのインヒビター

名称	公知の薬理学的活性
クロミブラミン	セロトニン取り込みインヒビター
6-ニトロキパジン	セロトニン取り込みインヒビター
フルボキサミン	セロトニン取り込みインヒビター
メチオセピン	5HT1, 2アンタゴニスト
5-ノニルオキシトリウタミンオキサレート	5HT1Bアゴニスト
N-デスメチルクロザピン	5HT2Cアンタゴニスト
3-メトキシカルボニルアミノ-b-カルボリン	ベンゾジアゼピンレセプターインヒビター
7-(ジメチルカルバモイルオキシ)-6-フェニルピロロ	ベンゾジアゼピンレセプターインヒビター
ニモジピン	Caチャネル遮断薬
CP 55,940	カンナビノイドアゴニスト
WIN 55,212-2	カンナビノイドアゴニスト
WIN 64338	カンナビノイドアゴニスト
HU 210	カンナビノイドアゴニスト
ブロモクリプチン	D2アゴニスト
1-(2-ベンゾ[b]チエニル)-N-ブチルシクロヘキサナミン	ドーパミン取り込みインヒビター

【0226】

【表19】

表11のつづき

名称	公知の薬理学的活性
1-[1-(2-ベンゾ[b]チエニル)シクロヘキシル]ピロリジン	ドーパミン取り込みインヒビター
2-アミノ-4-メチルピリジン	iNOSインヒビター
17-ODYA	ロイコトリエンB4ヒドロラーゼインヒビター
エタゾレート	PDE4インヒビター
シス-(n)-N-メチル-N-[2-(3,4-ジクロロフェニル)]-	σ レセプターリガンド
N-エキソ-ビスクロ[2,2,1]ヘプト-2-イル-N'-(2-ヨードフェニル)-	σ レセプターリガンド (ハロペリドール感受性)
L-732,138	物質Pレセプターアンタゴニスト
シクロスポリンA	リン酸カルシニューリン活性インヒビター
ジオクタノイルグリコール	ジアシルグルセロールキナーゼインヒビター
LY 225910	CCKBRレセプターアンタゴニスト
α -NETA	コリンアセチルトランスフェラーゼインヒビター
4-ナフタルイミド酪酸	アルドースレダクターゼインヒビター
エルゴタミン	抗片頭痛薬、分娩促進薬

【図面の簡単な説明】

【図1】 *C. elegans*のポンピング速度に対する直接的栄養を有することが公知のニューロンおよび神経伝達物質の概要を示す図である。

【図2】 蛍光読み出しを使用した*C. elegans*咽頭のポンピング速度のエンハンサーの検出例を示す図である。

【図3】 蛍光読み出しを使用した*C. elegans*咽頭のポンピング速度のインヒビターの検出例を示す図である。

【図4】 インヒビタータモキシフェン、BP554、およびピマジドの用量反応曲線を示す図である。

【図5】 DMSOの毒作用を示すエンハンサークロミピラミンの用量反応曲線を示す図である。

【図6】 高濃度でのエンハンサー効果および高濃度でのインヒビター効果を示すタプシガルジンの用量反応曲線を示す図である。

【図7】 運動性アッセイの原理を示す図である。

【図8】 運動性アッセイを使用した化学的基質選択およびアンタゴニスト選択の原理を示す図である。

【図9】 線虫の時間（x軸）に対する自己蛍光（y軸）の変化を示す代表的な運動性アッセイの結果を示す図である。

【図10】 咽頭ポンピングアッセイの能力に対するPEG8000の効果を示すための実験結果を示す。100匹の線虫（HD8株）を0.5 μ Mカルセイン-AMの存在下で3時間インキュベートした。0.1%PEGを添加するか添加しないで取扱った。

【図11】 咽頭ポンピングアッセイの能力に対する培地の粘度の効果を示すための実験結果を示す。

【図12】 比較研究における種々の*C. elegans*変異体の運動性アッセイの能力に対する培地粘度の効果を示す図である。100匹の蠕虫を丸底マイクロタイタープレート中でインキュベートした。種々の粘性培地（M9、培地粘性カルボキシメチルセルロース、および高粘度カルボキシメチルセルロース）の340nmのODを測定した。3連で測定を行った。

【図13】 図12と同様である。

【図14】 咽頭ポンピングスクリーニングに対する培地の粘度の効果を示す図である。N2+MCは、カルボキシメチルセルロースを含む培地中の野生型

蠕虫を示す。

【図15】 図14と同様である。

【図16】 蛍光基質を使用したキチナーゼ活性の検出に基づくN2蠕虫を使用した産卵アッセイの反応速度を示す図である。それぞれ種々の濃度のクロミブラミンおよびフルオキセチンの存在下でアッセイを行った。

【図17】 図16と同様である。

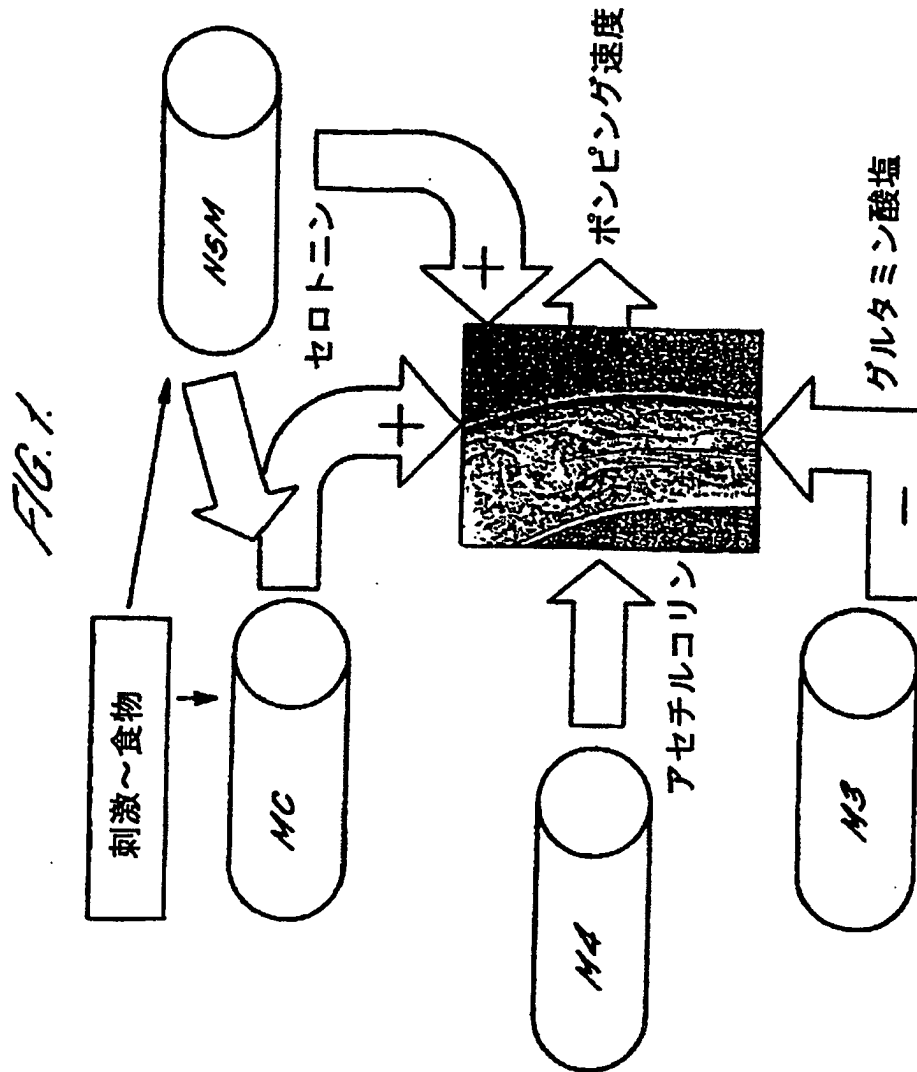
【図18】 *C. elegans*の咽頭ポンピング速度に対する公知の殺虫活性化合物の効果を示す図である。図18ーピクロトキシン、図19ーロテノン、図20ーディルドリン、図21ーイベルメクチン。殺虫剤への暴露による咽頭ポンピング速度の減少が明らかに認められる。

【図19】 図18と同様である。

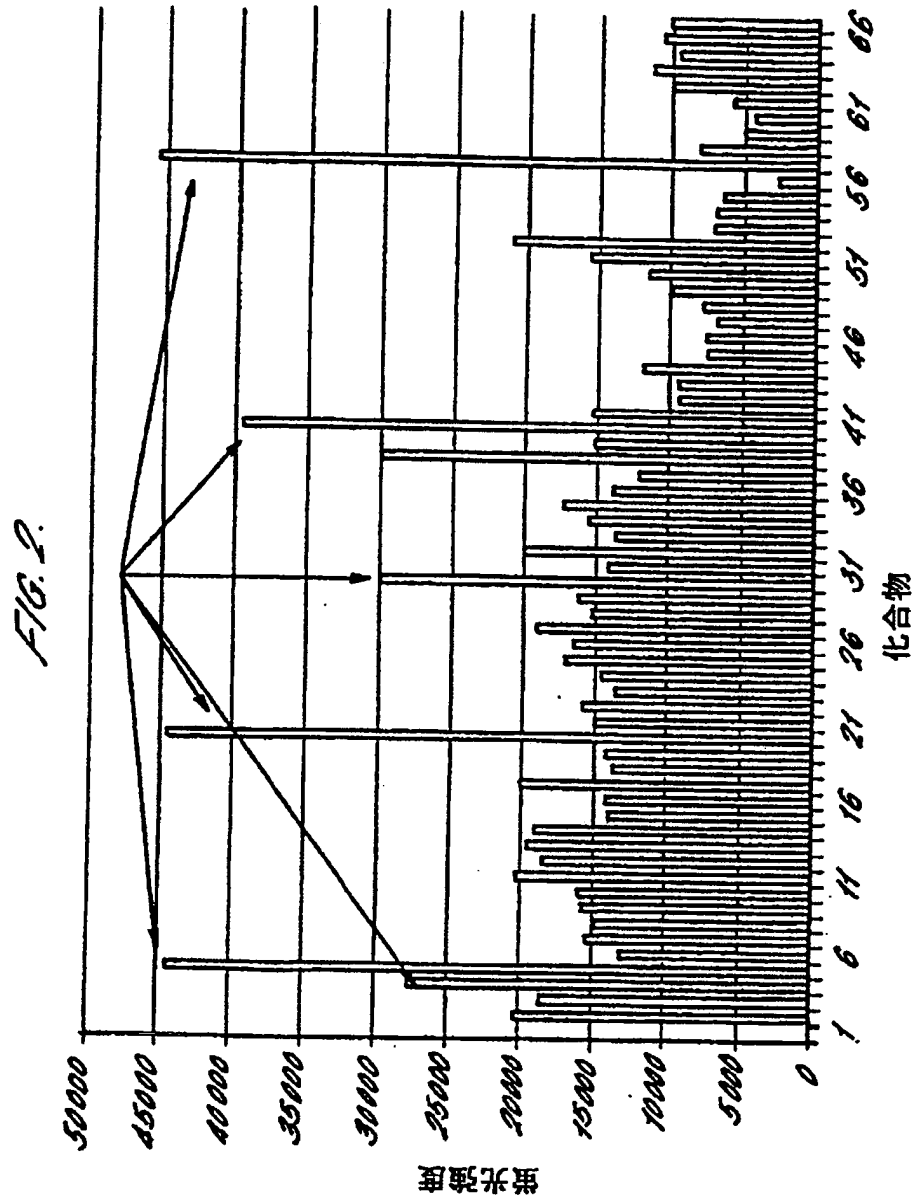
【図20】 図18と同様である。

【図21】 図18と同様である。

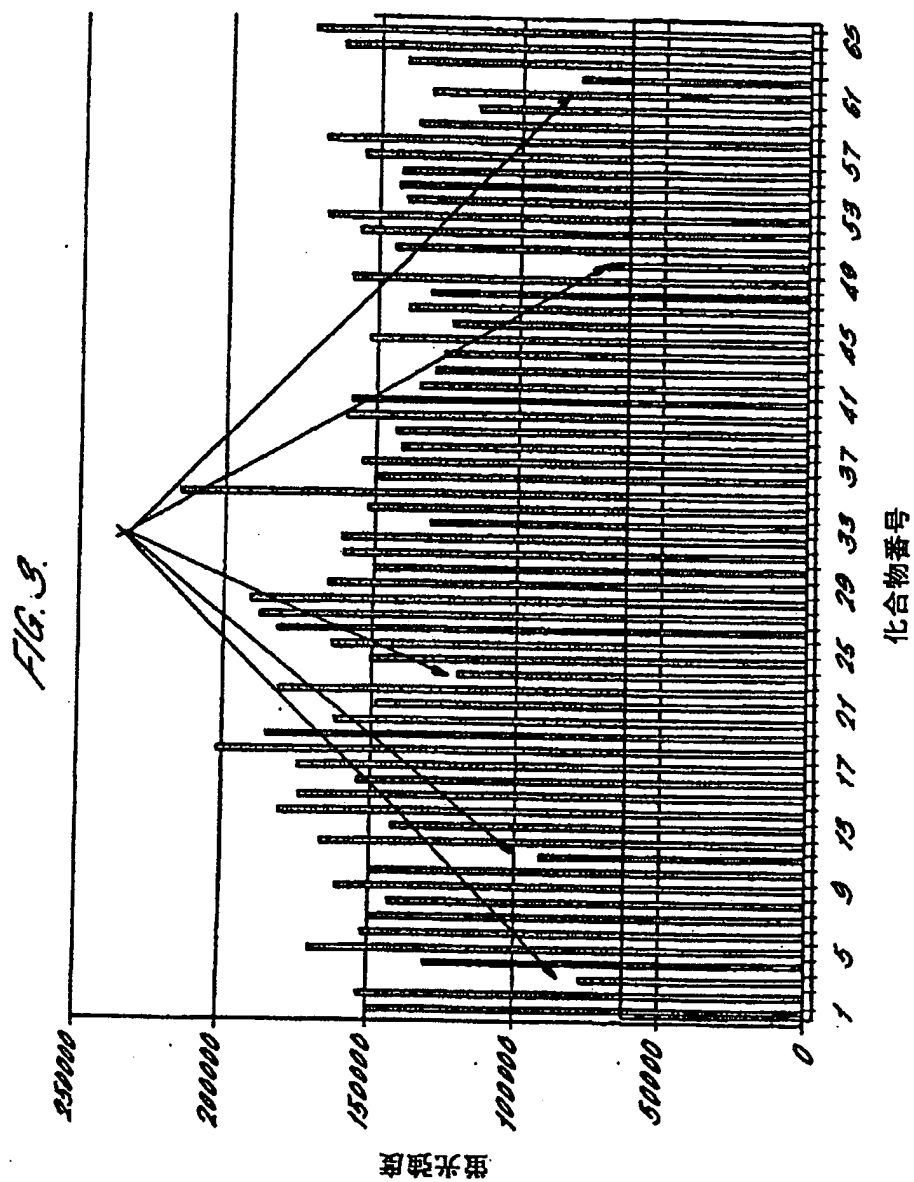
【図1】



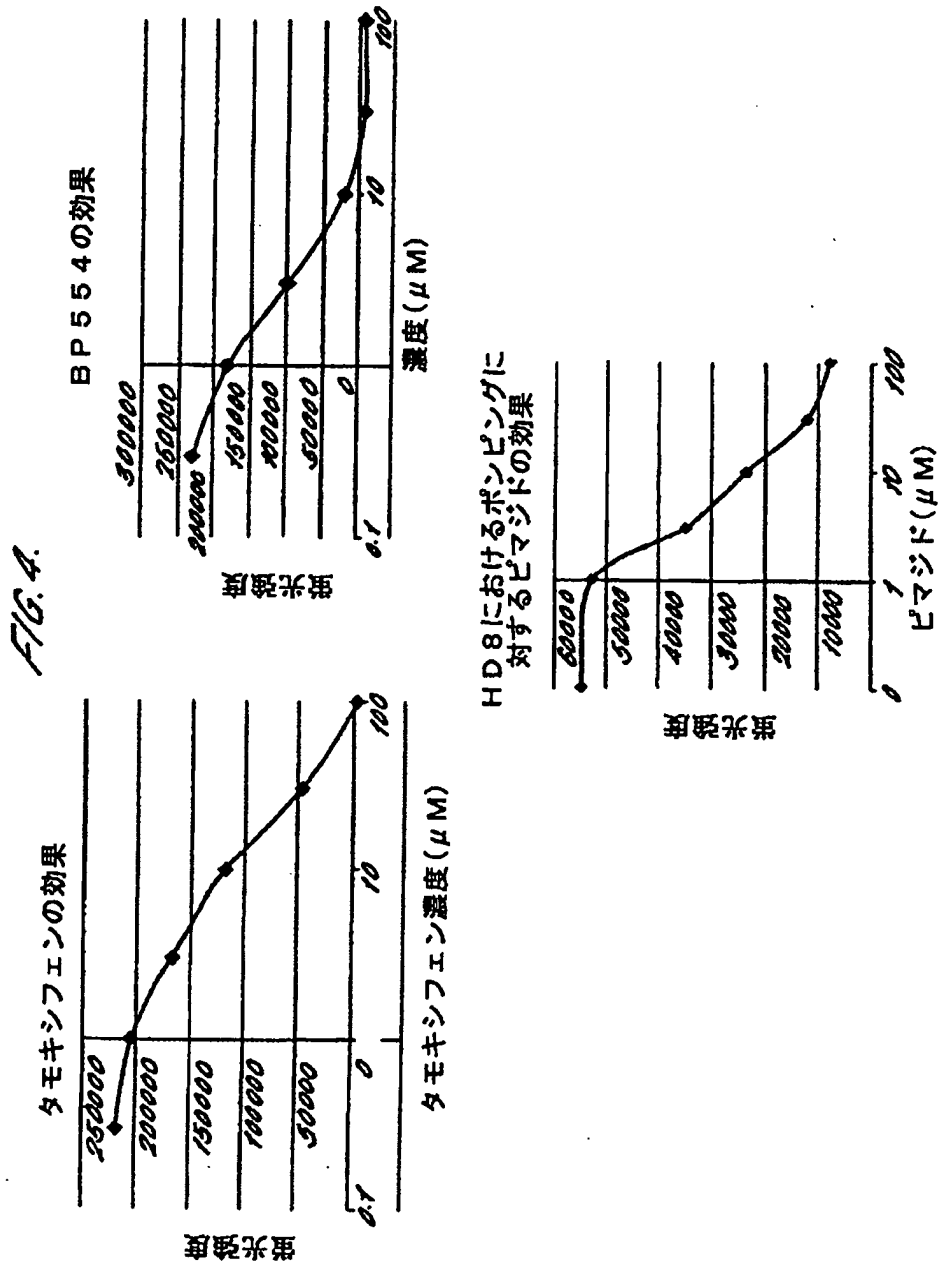
【图2】



【图 3】

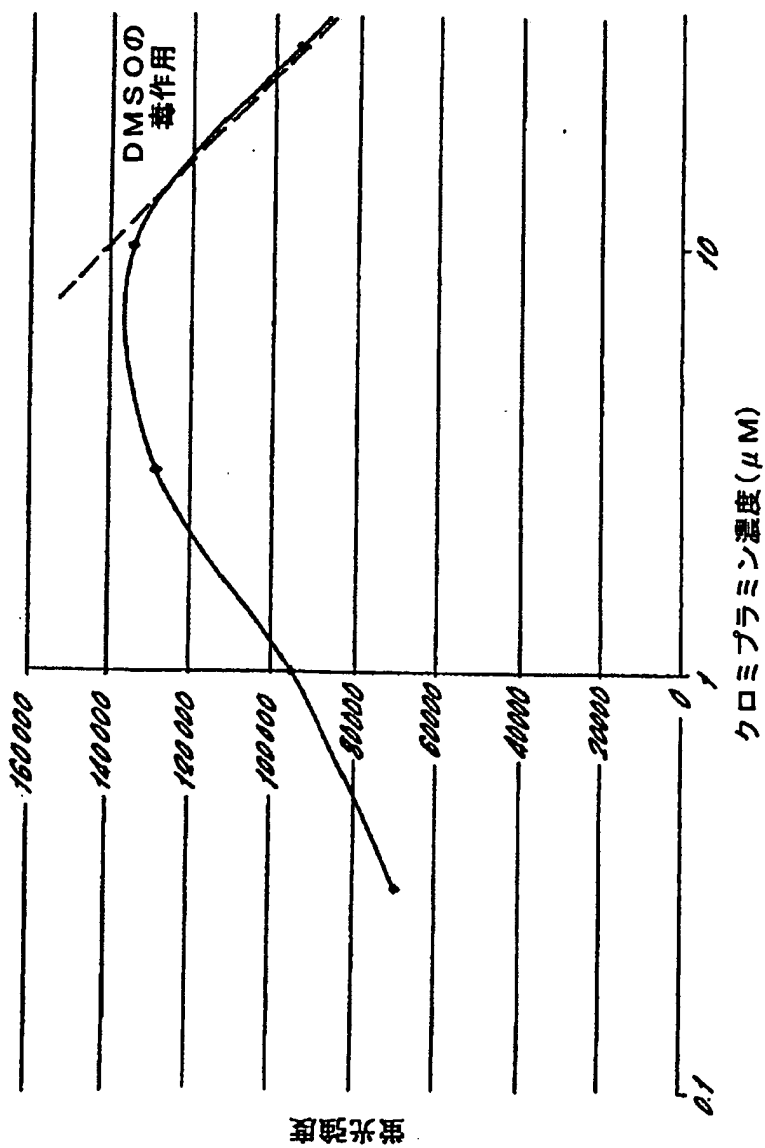


【図 4】



【図 5】

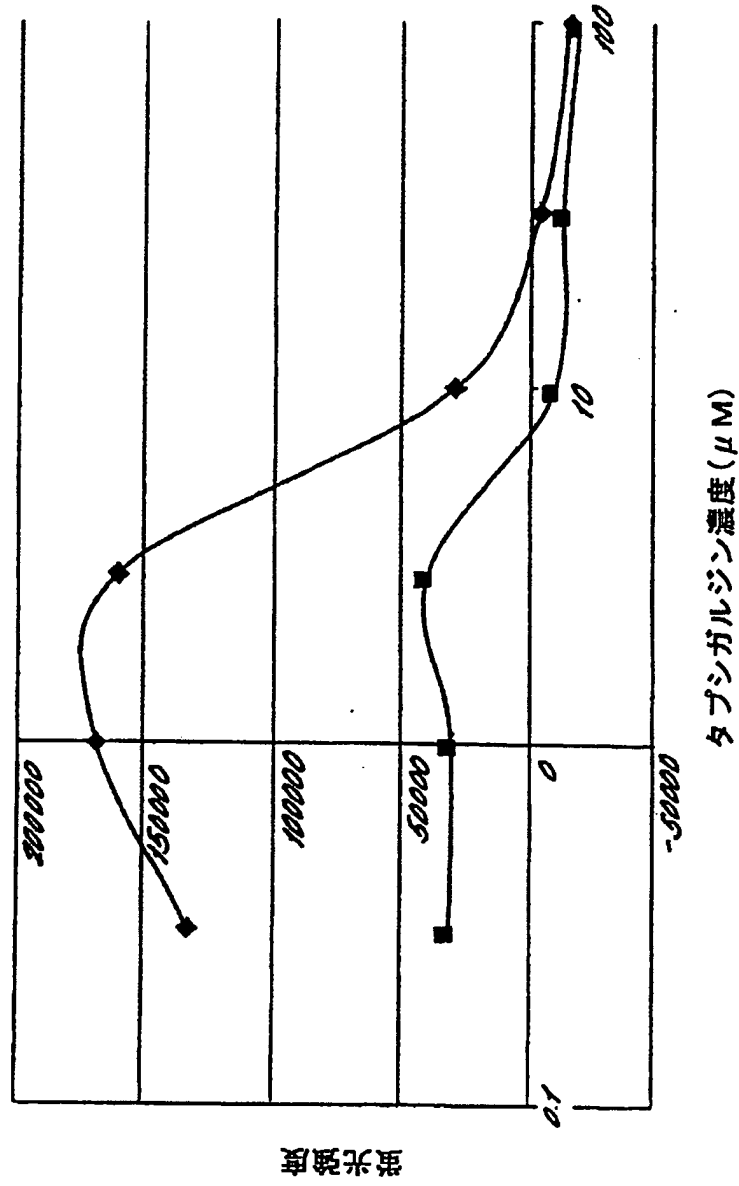
FIG. 5.
クロミプラミンの効果



【図 6】

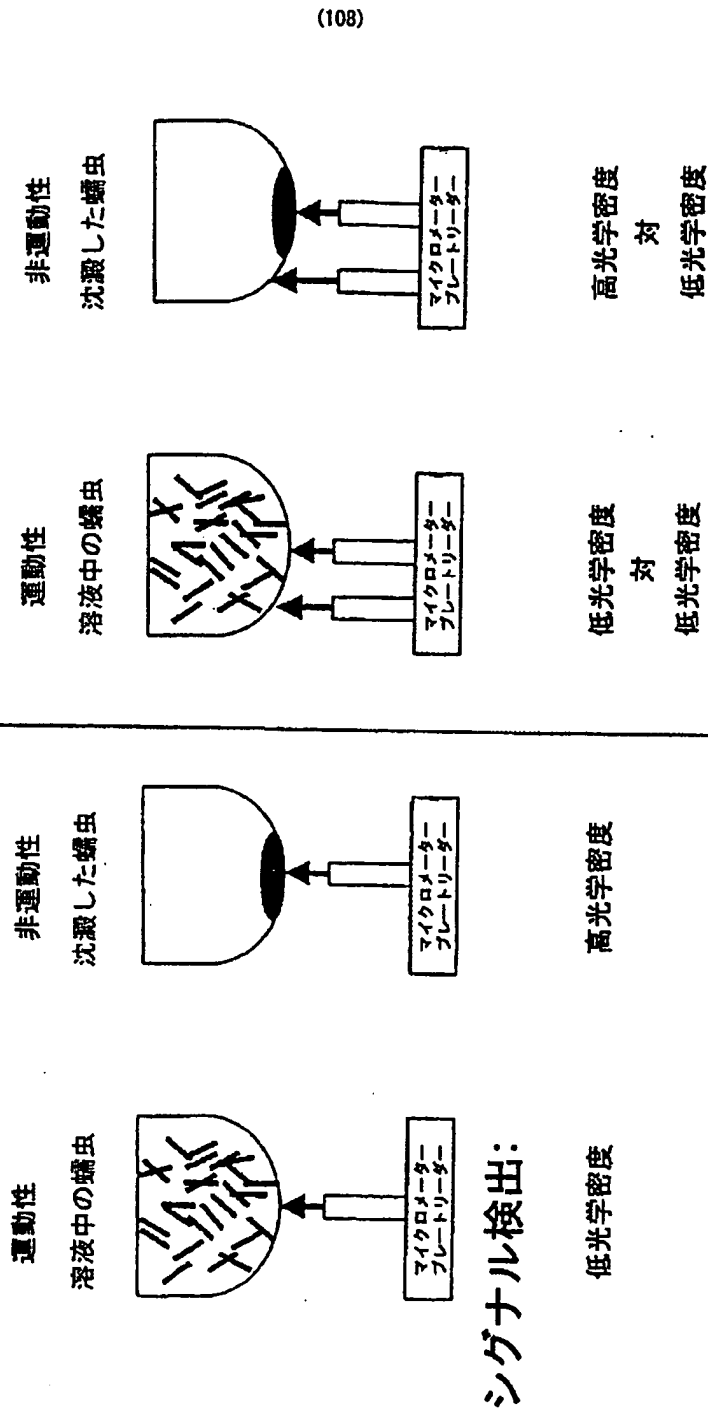
FIG. 6.

N 2およびHD 8におけるドリッキングに対するタシガルジンの効果



【図 7】

FIG. 7.



【図 8】

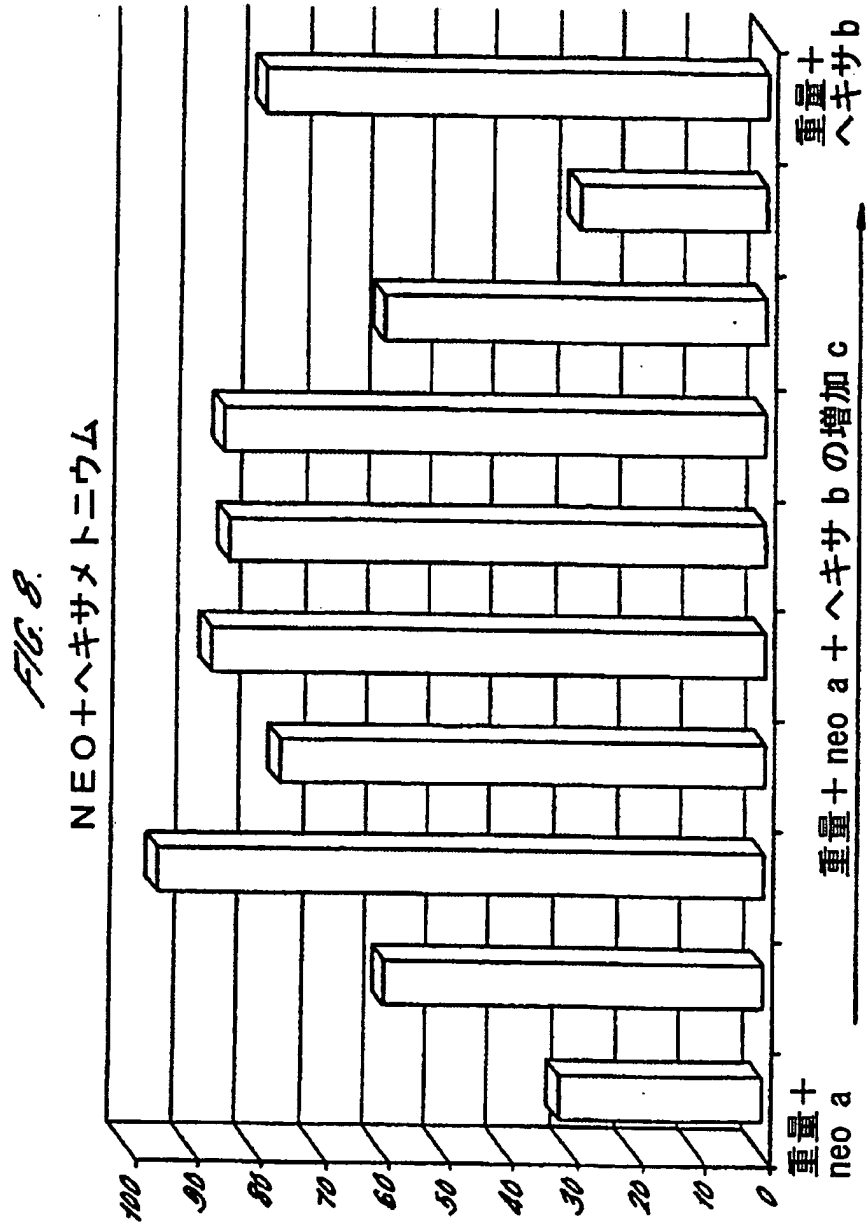
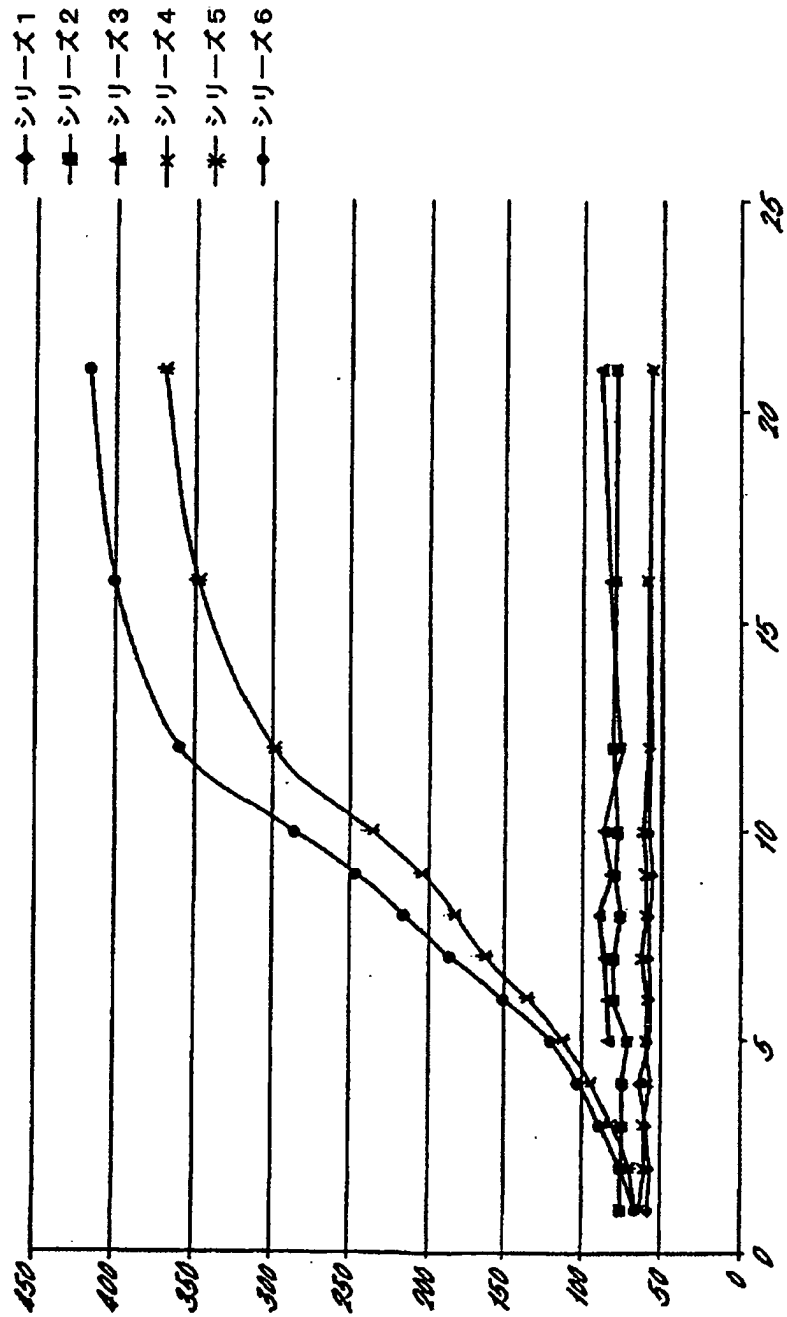
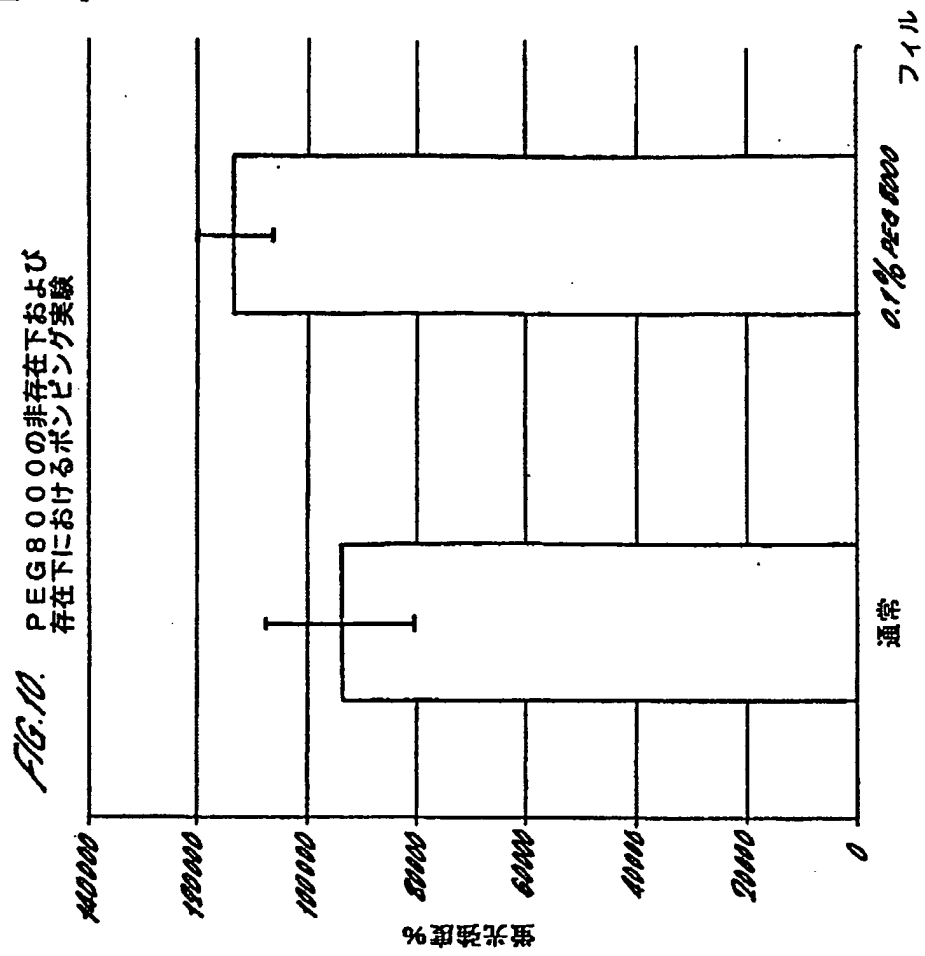


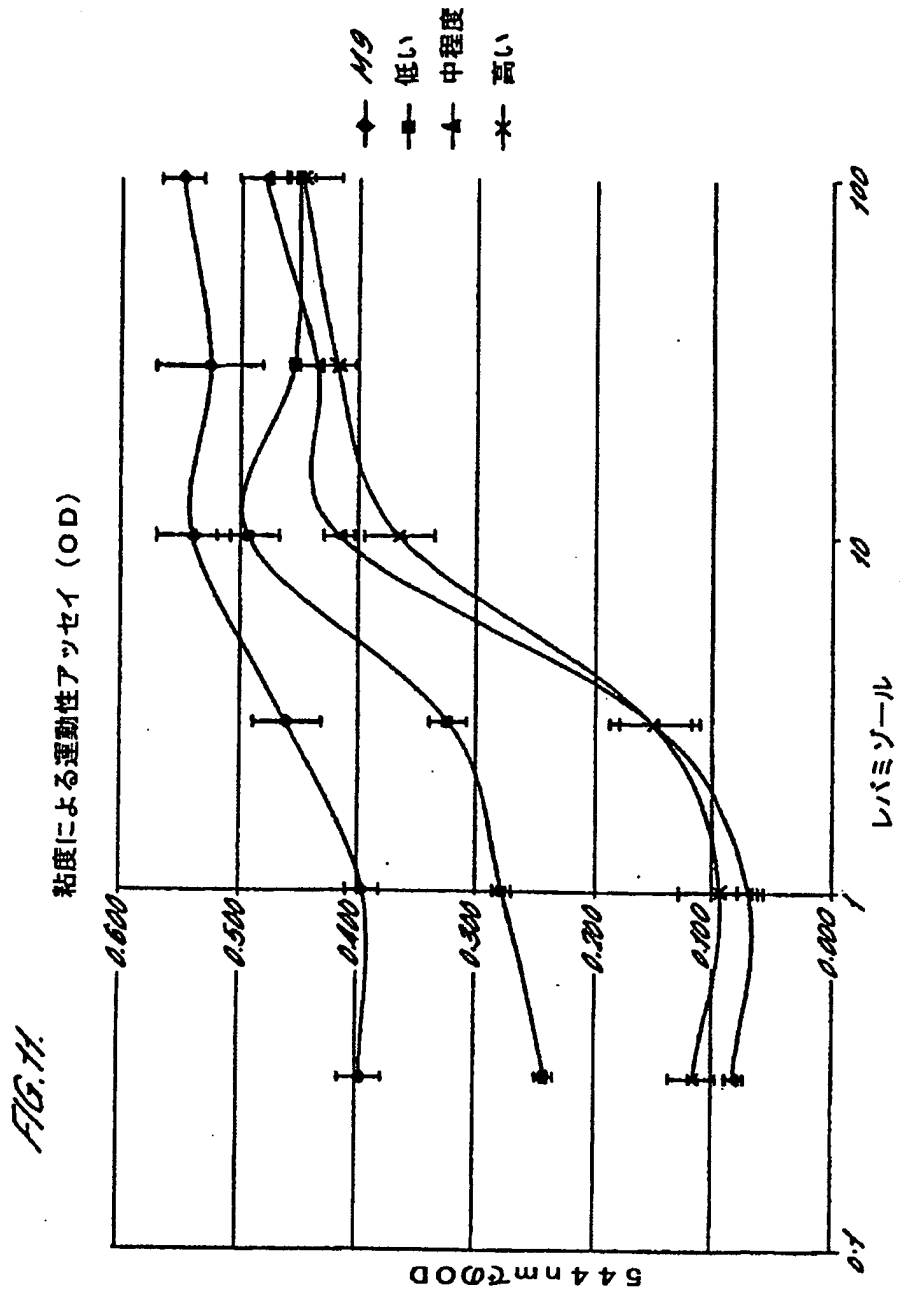
Fig. 9.



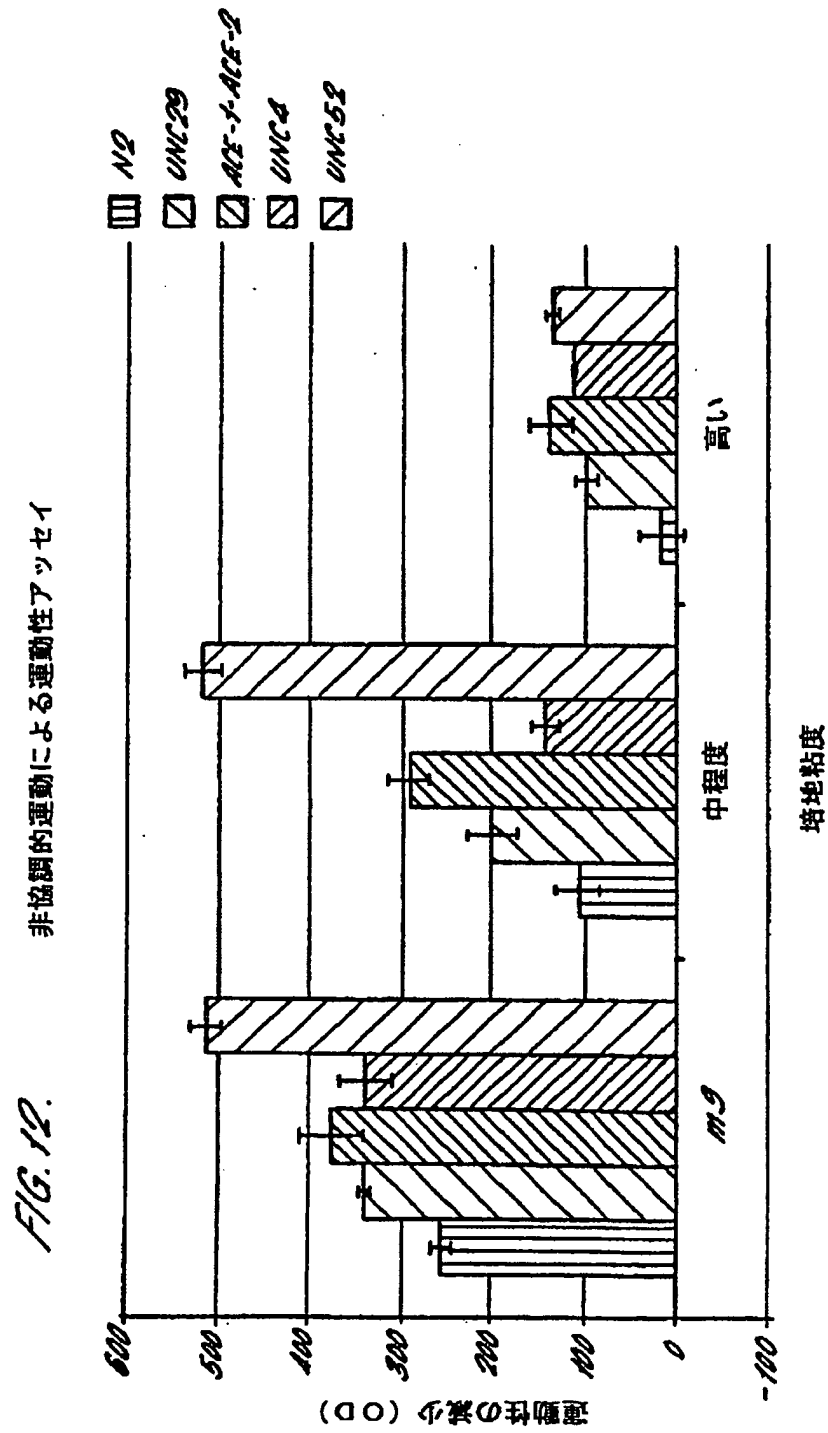
【図10】



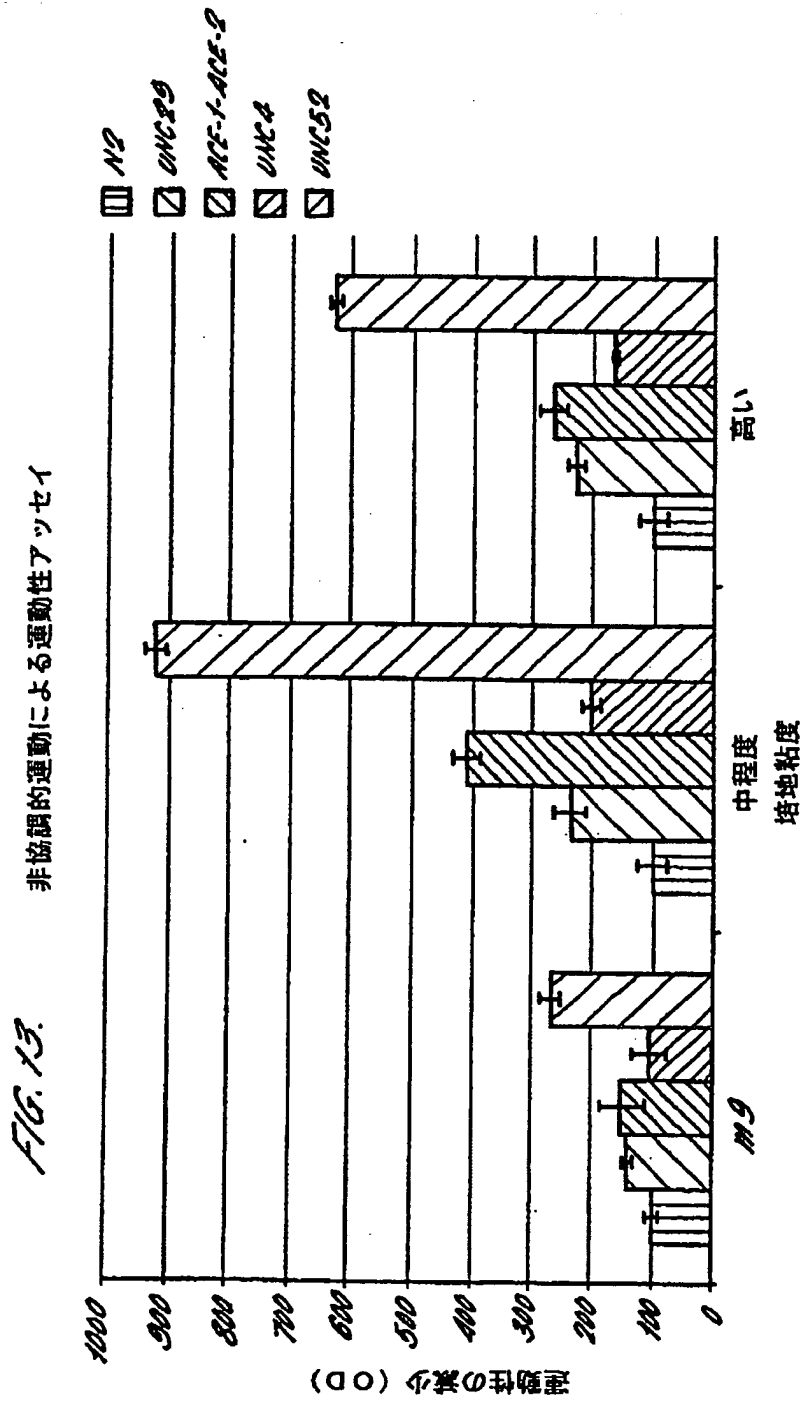
【図 1 1】



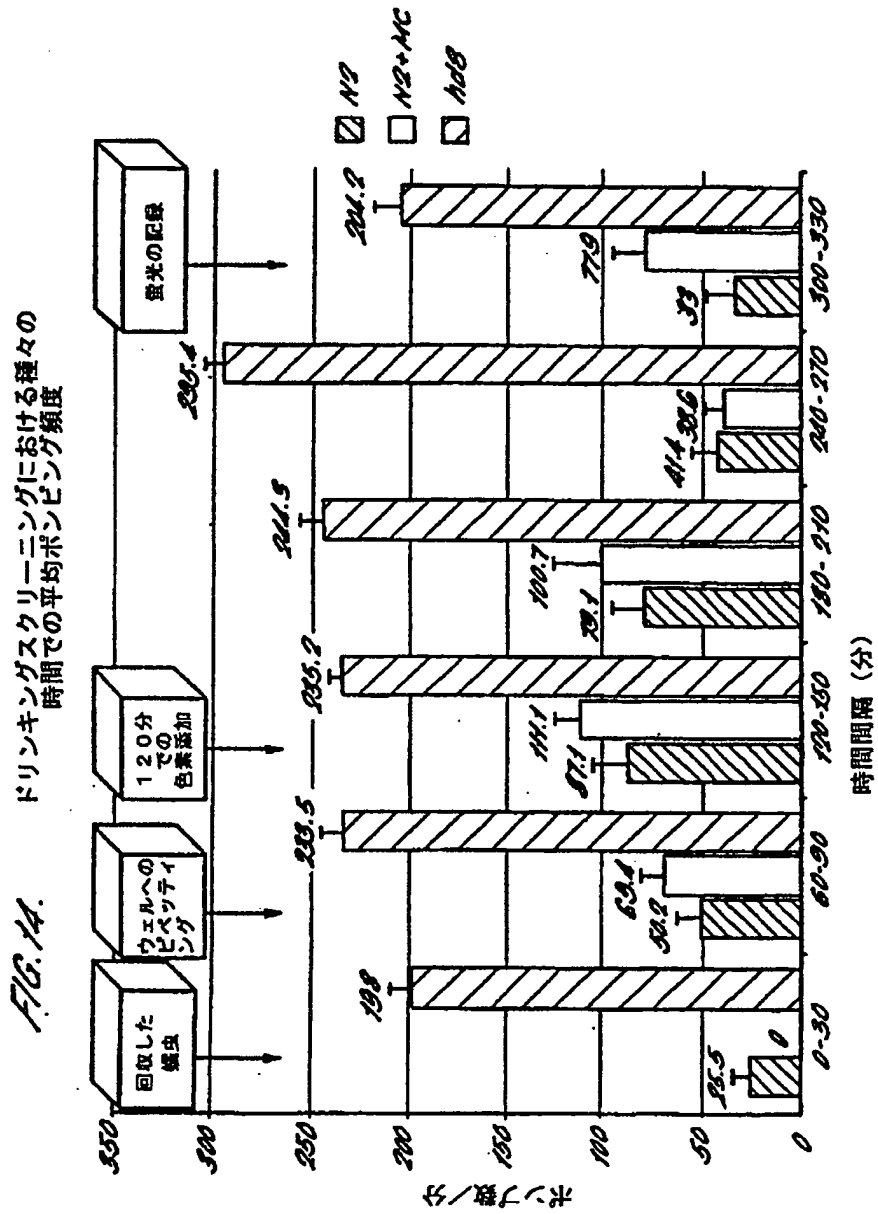
【図12】



【図 13】



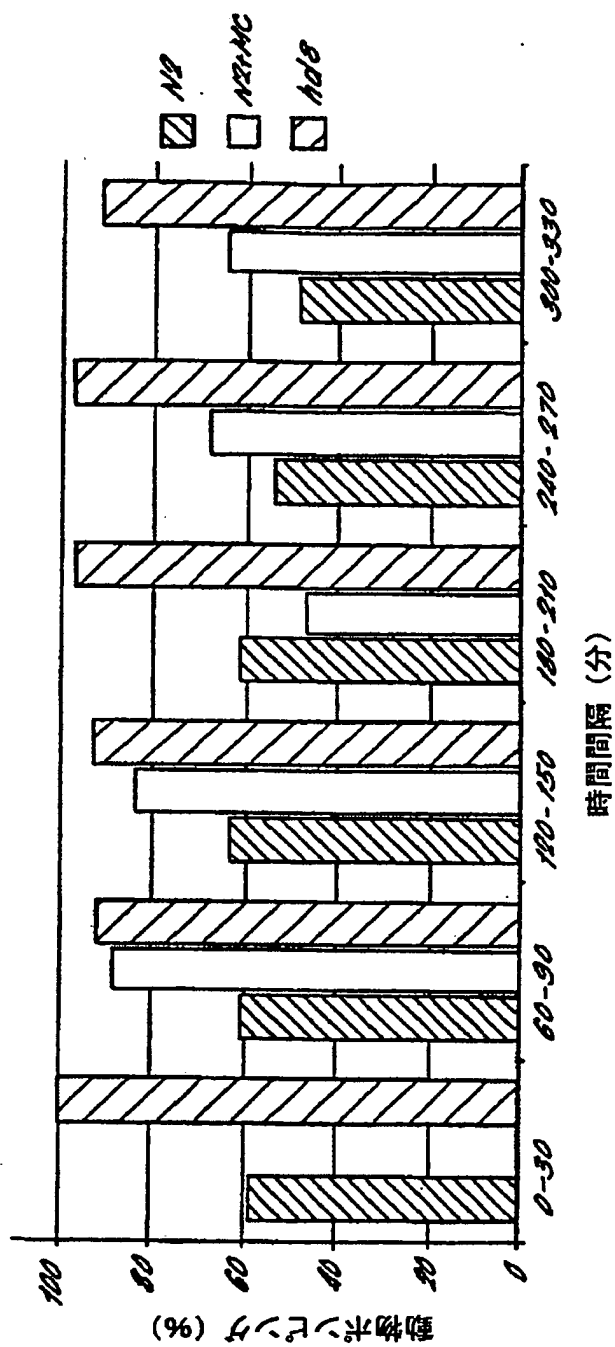
【図 14】



【図15】

FIG. 15.

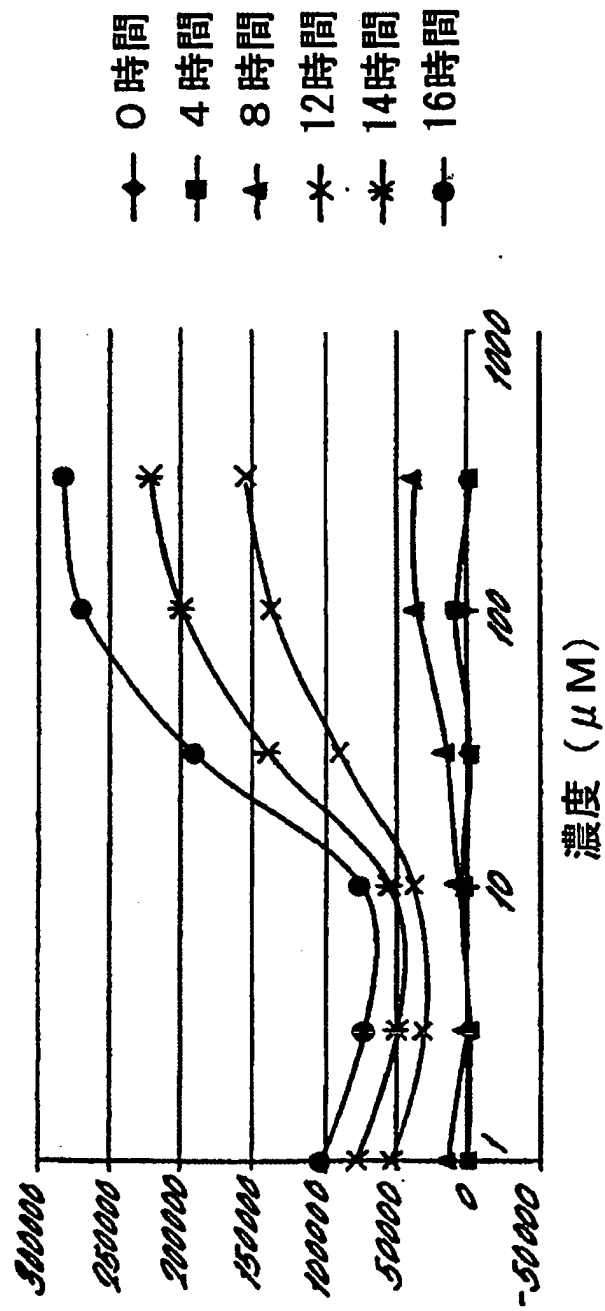
試験した時間間隔におけるポンピング動物の百分率



【図16】

FIG. 16.

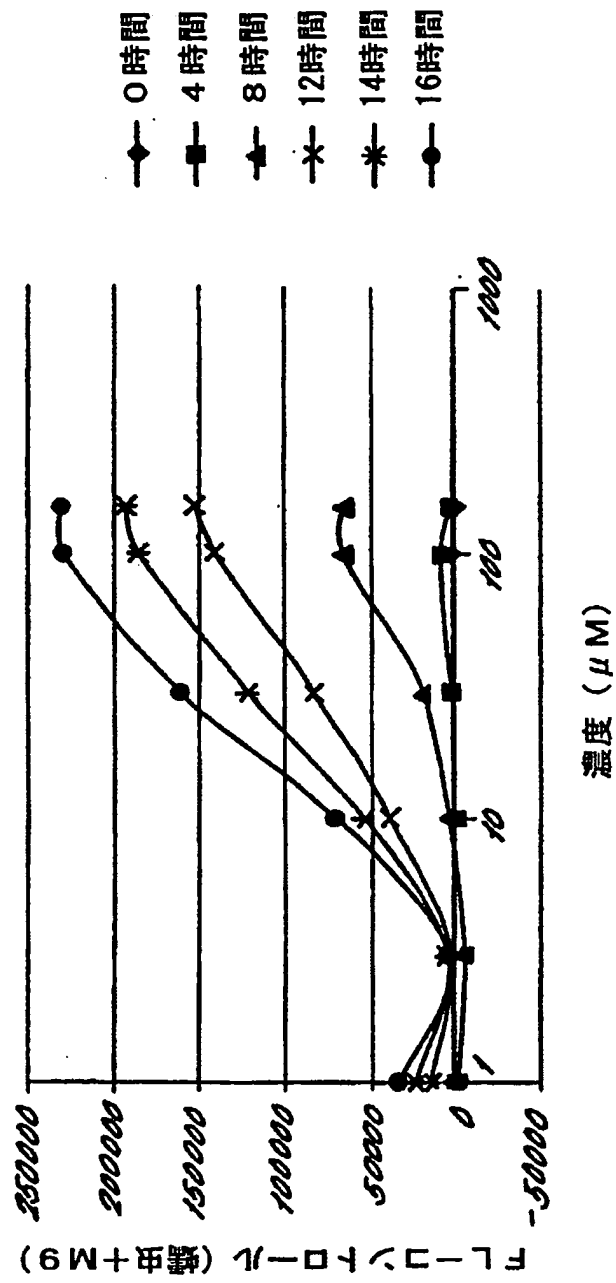
クロミプラミンの存在下でのN2の産卵速度



【図 17】

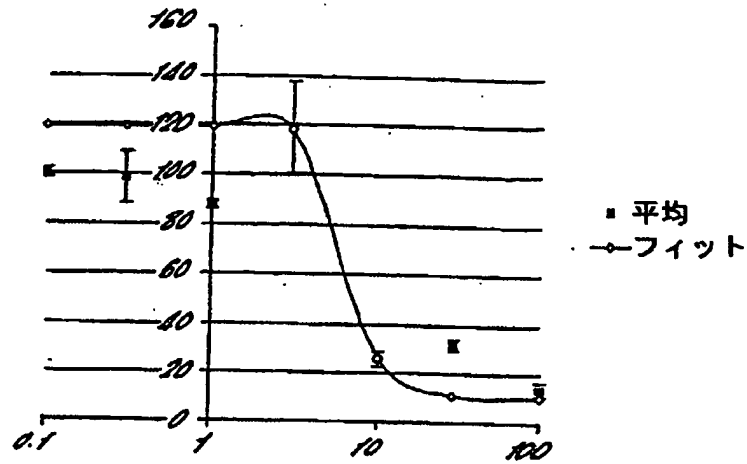
FIG. 77.

フルオキシセチンの存在下でのN2の産卵速度



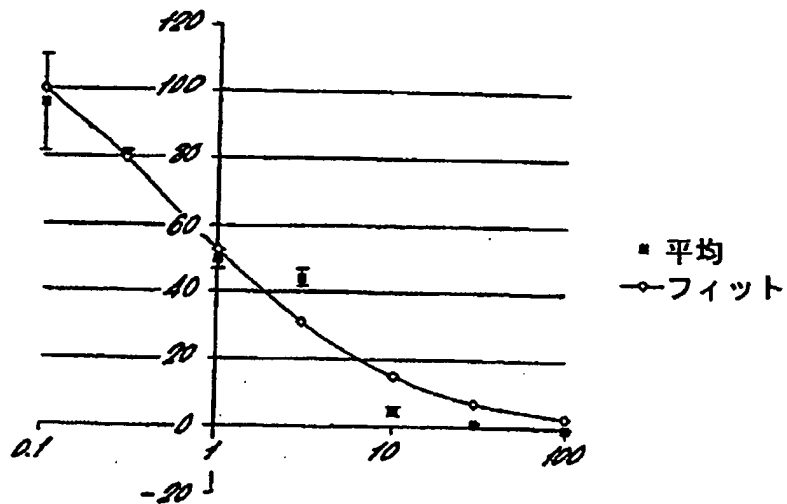
【図18】

FIG. 18.
殺虫剤ピクロトキシニンによる咽頭
ポンピングの減少



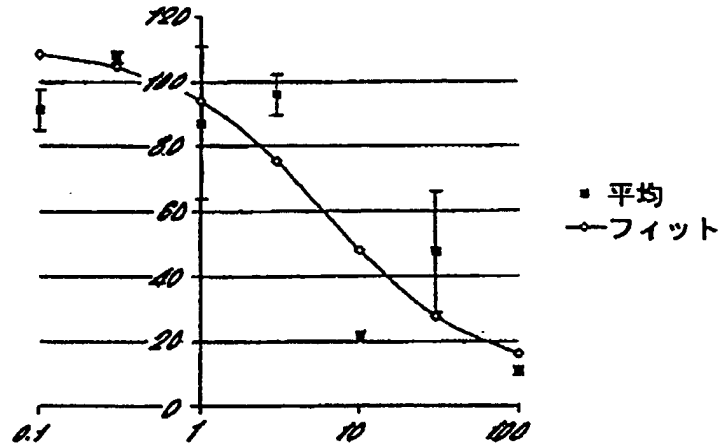
【図19】

FIG. 19.
殺虫剤ロテノンによる咽頭
ポンピングの減少



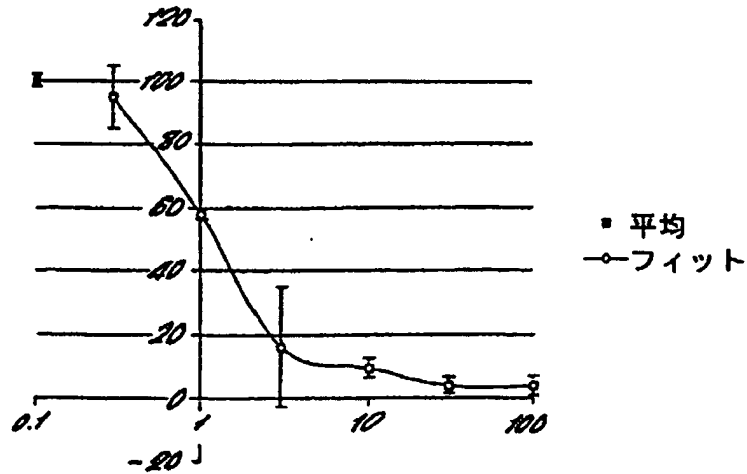
【図20】

FIG. 20.

殺虫剤ディルドリンによる咽頭
ポンピングの減少

【図21】

FIG. 21.

殺虫剤イベルメクチンによる咽頭
ポンピングの減少

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 00/00575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/02 C12Q1/18 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, NEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 34438 A (CRIEKGINGE WIM VAN ;FEICHTINGER RICHARD (BE); DEVGEN NV (BE); KALET) 15 June 2000 (2000-06-15) page 34, line 17 - line 35 page 35, line 26 - page 36, line 9 -----	1-13, 17-22, 27-29, 44-63, 68-76,85
X	WO 98 53856 A (GEN HOSPITAL CORP) 3 December 1998 (1998-12-03) -----	1-11, 17-22, 27-29
Y	page 21, line 23 - page 26, line 4; claims 1-6 -----	1,12,13
X	WO 98 51351 A (GEN HOSPITAL CORP) 19 November 1998 (1998-11-19) -----	1-11, 17-22, 27-29
Y	page 115; claims 1-3,7-9,18 -----	1,12,13
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "P" earlier document not published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 February 2001		Date of mailing of the international search report 08. 03. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Hart-Dav1s, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00575

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 09096 A (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE RES ;HORVITZ HOWARD ROBERT (US)) 23 August 1990 (1990-08-23)	1-11, 17-22, 27-29, 98-118
Y	page 8, line 16 - line 22	1,12,13, 98,119, 120,122, 156,157, 159
	page 15, line 1 - line 5 examples 1-6	
X	JAMES B RAND, CARL D JOHNSON: "Genetic Pharmacology: Interaction between Drugs and Gene Products in Caenorhabditis elegans" METHODS IN CELL BIOLOGY (ACADEMIC PRESS), VOLUME 48, CHAPTER 8, 1995, pages 187-204, XP000956211 cited in the application	1-11, 17-22, 27-29
Y	the whole document	1,12,13
X	WO 97 11956 A (UNIV COLUMBIA ;GREENWALD IVA (US); LEVITAN DIANE (US)) 3 April 1997 (1997-04-03)	1-11, 17-22, 27-29, 127-153
Y	page 43, line 1 - line 34; claim 47	1,12,13, 127,156, 157,159
Y	LEITCH GORDON J; SCANLON MARY; SHAW ANDREW; VISVESVARA GOVINDA S; WALLACE SARA: "Use of a fluorescent probe to assess the activities of candidate agents against intracellular forms of Encephalitozoon microsporidia" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 41, 1997, pages 337-344, XP000957827 the whole document	1,12,13
Y	BERNHARD JOAN M; NEWKIRK SARAH G; BOWSER SAMUEL S: "Towards a non-terminal viability assay for foraminiferan protists" JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY, vol. 42, 1995, pages 357-367, XP000957895 abstract	1,12,13

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 00/00575

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIDDLE D L ET AL: "RESPONSES OF THE PLANT PARASITIC NEMATODES ROTYLENCHULUS-RENIFORMIS ANGUINA-AGROSTIS AND MELOIDOGYNE-JAVANICA TO CHEMICAL ATTRACTANTS" PARASITOLOGY, vol. 91, no. 1, 1985, pages 185-195, XP000987067 ISSN: 0031-1820	1,36,37, 39
Y	the whole document	98,119, 120,122, 127,156, 157,159
X	CASTRO C E ET AL: "QUANTITATIVE BIOASSAY FOR CHEMOTAXIS WITH PLANT PARASITIC NEMATODES ATTRACTANT AND REPELLENT FRACTIONS FOR MELOIDOGYNE-INCIGNITA FROM CUCUMBER ROOTS" JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY, vol. 15, no. 4, 1989, pages 1297-1310, XP000984197 ISSN: 0098-0331	1,36,37, 39, 98-120, 122
Y	the whole document	127,156, 157,159
X	BALAN J: "Measuring Minimal Concentrations of Attractants Detected by the Nematode Panagrellus redivivus" J.CHEM.ECOL., vol. 11, no. 1, 1985, pages 105-111, XP000987221	1,36,37, 39, 98-120, 122
Y	the whole document	127,156, 157,159
X	AVERY L ET AL: "EFFECTS OF STARVATION AND NEUROACTIVE DRUGS ON FEEDING IN CAENORHABDITIS ELEGANS" JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, XX, XX, vol. 253, 1990, pages 263-270, XP000957778 ISSN: 0022-104X	44-63, 68-76,85
Y	the whole document	44,77, 78,80
X	LAUGHTON D L ET AL: "REPORTER GENE CONSTRUCTS SUGGEST THAT THE CAENORHABDITIS ELEGANS AVERNECTIN RECEPTOR BETA-SUBUNIT IS EXPRESSED SOLELY IN THE PHARYNX" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, COMPANY OF BIOLOGISTS, CAMBRIDGE, GB, vol. 200, 1997, pages 1509-1514, XP000957798 ISSN: 0022-0949	44-63, 68-76,85
Y	the whole document	44,77, 78,80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00575

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWNLEE D J A ET AL: "Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, <i>Ascaris suum</i> ." PARASITOLOGY, vol. 115, no. 5, November 1997 (1997-11), pages 553-561, XP000987095 ISSN: 0031-1820 the whole document	44-63, 68-76,85
X	BENNETT J L ET AL: "MICROMOTILITY METER AN INSTRUMENT DESIGNED TO EVALUATE THE ACTION OF DRUGS ON MOTILITY OF LARVAL AND ADULT NEMATODES" PARASITOLOGY, vol. 93, no. 2, 1986, pages 341-346, XP000987207 ISSN: 0031-1820 the whole document	98-106, 108-118
Y		98,119, 120,122
X	DAS A K ET AL: "SIMPLE MICROMOTILITY RECORDER FOR RAPID SCREENING OF POTENTIALLY ANTHELMINTIC COMPOUNDS" JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL METHODS, vol. 20, no. 4, 1988, pages 323-328, XP000987084 ISSN: 0160-5402 the whole document	98-106, 108-118
Y		98,119, 120,122
X	LORIMER STEPHEN D ET AL: "A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products." JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 44, no. 9, 1996, pages 2842-2845, XP000982455 ISSN: 0021-8561 the whole document	98-106, 108-118
Y		98,119, 120,122
X	US 4 444 891 A (MIWA JOHJI ET AL) 24 April 1984 (1984-04-24) claims 1-11	1-11, 17-22, 27-29
X	WO 99 05307 A (GREENWALD IVA ;UNIV COLUMBIA (US); HUBBARD E JANE (US)) 4 February 1999 (1999-02-04) claims 36,37	1-11, 17-22, 27-29
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00575

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 02684 A (MURAKAMI SHIN ; JOHNSON THOMAS E (US); UNIV TECHNOLOGY CORP (US)) 21 January 1999 (1999-01-21) claims 19-23	1-11, 17-22, 27-29
X	WO 98 54300 A (AXYS PHARM INC) 3 December 1998 (1998-12-03) claims 5,6	1-11, 17-22, 27-29
A	HOLLO ZSOLT; HOMOLYA LASZLO; DAVIS C WILLIAM; SARKADI BALAZS: "Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1191, 1994, pages 384-388, XP000957876 the whole document	1,12,13
A	TRAUNSPURGER WALTER ET AL: "Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with Caenorhabditis elegans (Nematoda): A method for testing liquid medium and whole-sediment samples." ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, vol. 16, no. 2, 1997, pages 245-250, XP000984198 ISSN: 0730-7268 the whole document	1,36-39
A	WHITEHEAD A G ET AL: "VARIATION IN THE DEVELOPMENT OF STEM NEMATODES DITYLENCHUS-DIPSACI IN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT CROP PLANTS" ANNALS OF APPLIED BIOLOGY, vol. 111, no. 2, 1987, pages 373-384, XP000984189 ISSN: 0003-4746 abstract	1,36-39, 44, 77-80, 98, 119-122, 127, 156-159
A	RAIZEN D M ET AL: "INTERACTING GENES REQUIRED FOR PHARYNGEAL EXCITATION BY MOTOR NEURON NC IN CAENORHABDITIS ELEGANS" GENETICS, GENETICS SOCIETY OF AMERICA, AUSTIN, TX, US, vol. 141, December 1995 (1995-12), pages 1365-1382, XP000957777 ISSN: 0016-6731 the whole document	44-85

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/18 00/00575

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JENKINS D C ET AL: "THE AGGREGATION RESPONSE OF TRICHOSTRONGYLUS-COLUBRIFORMIS A BASIS FOR THE RAPID INTERPRETATION OF IN-VITRO ANTHELMINTIC SCREENS" PARASITOLOGY, vol. 93, no. 3, 1986, pages 531-538, XP000987209 ISSN: 0031-1820 the whole document	98,107
A	SANON A ET AL: "Kinetic parameters of N-acetylglucosaminidase in adult female Nippostrongylus brasiliensis by a quantitative colorimetric micromethod." PARASITE, vol. 3, no. 2, 1996, pages 115-118, XP000987085 ISSN: 1252-607X page 118	127,154, 155
A	ROGERS W P: "ENZYMES IN THE EXSHEATHING FLUID OF NEMATODES AND THEIR BIOLOGICAL SIGNIFICANCE" INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, vol. 12, no. 6, 1982, pages 495-502, XP000987208 ISSN: 0020-7519 abstract	127,154, 155
A	BONE L W ET AL: "EGG ENZYMES OF THE RUMINANT NEMATODE TRICHOSTRONGYLUS-COLUBRIFORMIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF INVERTEBRATE REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 14, no. 2-3, 1988, pages 299-302, XP000987097 ISSN: 0168-8170 the whole document	127,154, 155
A	THOMPSON D P ET AL: "Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery." PARASITOLOGY, vol. 113, no. SUPPL., 1996, pages S217-S238, XP000987094 ISSN: 0031-1820 the whole document	

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 00/00575

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to CBPO No.
A	<p>MAULE A G ET AL: "Nematode FMRamide-related peptide (FaRP)-systems: Occurrence, distribution and physiology." INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, vol. 26, no. 8-9, 1996, pages 927-936, XP000987202 ISSN: 0020-7519 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 00/00575

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11 (partially), 12, 13, 17-22 (partially),
27-29 (partially)

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein a signal is detected indicating phenotypic, physiological, behavioural or biochemical changes in the nematode worms, the signal comprising detecting a change in a measurable property (luminescence, fluorescence or colour) of a marker molecule capable of being cleaved by the action of an enzyme present in the gut of the nematodes.

2. Claims: 1-11 (partially), 14-16, 17-22 (partially),
27-29 (partially)

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein a signal is detected indicating phenotypic, physiological, behavioural or biochemical changes in the nematode worms, the signal comprising detecting a change in a measurable property of a genetically encoded marker molecule.

3. Claims: 1-11 (partially), 17-22 (partially), 23-26,
27-29 (partially)

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein substantially equal volumes of a homogeneous suspension of nematode worms are dispensed into each of the wells of a multi-well assay plate.

4. Claims: 1-11 (partially), 17-22 (partially),
27-29 (partially), 30-35

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using transgenic nematode worms expressing a toxic gene.

5. Claims: 1-11 (partially), 17-22 (partially),
27-29 (partially), 36-39

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein the methods are performed in a liquid assay medium containing a water soluble polymer (carboxymethyl cellulose, low melting point agarose or polyethylene glycol) to increase the viscosity of the medium.

6. Claims: 1-11 (partially), 17-22 (partially), 27-29 (partially), 40-43

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein the methods are performed in a liquid assay medium containing a water soluble polymer (polyethylene glycol, polyvinyl alcohol or polyvinylpyrrolidone) to prevent the nematode worms from sticking to the wells of the multi-well plate.

7. Claims: 44-85

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein changes are detected in the pharynx pumping rate.

8. Claims: 98-126

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein changes in movement behaviour of the nematode worms are detected.

9. Claims: 127-150 (partially), 151, 152-153 (partially), 156-163 (partially)

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein the amounts of eggs or offspring produced are detected using an antibody binding to eggs, L1 stage, L2 stage, L3 stage or L4 stage nematodes.

10. Claims: 127-150 (partially), 152-153 (partially), 154-155, 156-163 (partially)

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein the amounts of eggs produced

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

are detected by detecting the activity of an enzyme released from the eggs on hatching e.g. chitinase.

11. Claims: 164-186

Methods of identifying or studying the mode of action of compounds which have potential pharmacological activity using nematode worms, wherein changes in defecation behaviour of the nematode worms are detected.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 00/00575

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0034438 A	15-06-2000	AU 1975000 A	26-06-2000
WO 9853856 A	03-12-1998	EP 1015038 A	05-07-2000
WO 9851351 A	19-11-1998	AU 7494198 A	08-12-1998
		EP 1019092 A	19-07-2000
		PL 336858 A	17-07-2000
		HU 0002199 A	28-09-2000
WO 9009096 A	23-08-1990	AU 5106790 A	05-09-1990
WO 9711956 A	03-04-1997	AU 728251 B	04-01-2001
		AU 7251496 A	17-04-1997
		CA 2233297 A	03-04-1997
		EP 0854881 A	29-07-1998
		JP 11512611 T	02-11-1999
US 4444891 A	24-04-1984	JP 1175737 C	14-11-1983
		JP 55153599 A	29-11-1980
		JP 57029155 B	21-06-1982
		DE 3018900 A	27-11-1980
WO 9905307 A	04-02-1999	US 6087153 A	11-07-2000
		AU 8511098 A	16-02-1999
		EP 0998578 A	10-05-2000
WO 9902684 A	21-01-1999	AU 8296198 A	08-02-1999
WO 9854300 A	03-12-1998	AU 7708498 A	30-12-1998

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 クリスト・ブラテーウ

ベルギー、ペー9052ヘントーズウェイナールデ、テヒノロジーバルク9番、デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャップ

(72) 発明者 グヴラディ・クヴィリエ

ベルギー、ペー9052ヘントーズウェイナールデ、テヒノロジーバルク9番、デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャップ

(72) 発明者 ティエリー・ボゲール

ベルギー、ペー9052ヘントーズウェイナールデ、テヒノロジーバルク9番、デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャップ

Fターム(参考) 2G045 AA29 BB01 BB50 BB51 CB17

FB12

4B024 AA11 BA38 CA01 DA02 GA11